

UNIVERSITÉ LILLE NORD DE FRANCE
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

THÈSE POUR L'OBTENTION DU
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ LILLE NORD DE FRANCE
Discipline : MÉDECINE ET SANTÉ AU TRAVAIL

Nathalie CHÉROT-KORNOBIS

ÉVALUATION MÉTHODOLOGIQUE ET CLINIQUE DES MARQUEURS DE
L'ATTEINTE PULMONAIRE DANS L'AIR EXHALÉ:

Comparaison de sujets présentant
une pathologie respiratoire chronique et de sujets sains

Thèse dirigée par Annie SOBASZEK
EA 4483 Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine
Soutenue le 17 Juillet 2012

Jury :

Patrick BROCHARD
Jean Dominique DEWITTE
Jean Louis EDMÉ
Paul FRIMAT
Régis MATRAN
Roger MARTHAN
Rachel NADIF
Annie SOBASZEK

A mes rapporteurs

Monsieur le Professeur Patrick BROCHARD

*Vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie pour votre disponibilité ainsi que pour vos conseils lors de l'achèvement de ce travail.
Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.*

Monsieur le Professeur Roger MARTHAN

*Vous me faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail de thèse.
Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.*

Aux membres du jury

Monsieur le Professeur Jean Dominique DEWITTE

*Vous me faites un grand honneur en acceptant de faire partie de mon jury de thèse.
Soyez assuré de mon profond respect.*

Monsieur Jean Louis EDMÉ

*Vous m'avez accueillie, guidée, conseillée et soutenue pour ce travail. A votre contact, la rigueur scientifique à pris tout son sens. Votre bureau a toujours été ouvert et mes questions ont toujours trouvé leur réponse. C'est un honneur de pouvoir travailler à vos côtés.
Je vous prie de trouver ici le témoignage de mon profond respect.*

Monsieur le Professeur Paul FRIMAT

*Vous m'avez accueillie dans la discipline. Je vous remercie de la confiance que vous avez su m'accorder tout au long de mon cursus.
Soyez assuré de ma respectueuse gratitude.*

Monsieur le Professeur Régis MATRAN

*Vous m'avez ouvert les portes de votre service et accueillie à bras ouverts.
Veuillez trouver, ici, l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.*

Madame Rachel NADIF

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Vous connaissez particulièrement ce sujet et je suis très intéressée par votre avis. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A ma directrice de thèse

Madame le Professeur Annie SOBASZEK

Vous m'avez conseillée, encouragée et soutenue tout au long de ce travail de thèse avec bienveillance et disponibilité. A vos côtés j'ai pu dépasser mes limites. Par ce travail, j'espère faire honneur à vos enseignements et être digne de la confiance que vous m'avez accordée.

Soyez assurée de mon entier dévouement et de mon profond respect.

A mes compagnons de recherche

Madame le Docteur Virginie de Broucker
Monsieur le Docteur Sébastien HULO

*Votre présence est importante et contribue largement à la bonne ambiance du laboratoire. Merci pour votre soutien et surtout aux litres de condensats offerts gracieusement.
Soyez assurés de mon profond attachement et de mon respect.*

A l'équipe du laboratoire PIPLE

Jessica, Catherine et Sidi, merci pour votre aide.

A l'équipe du service des EFR

Je tiens à vous remercier pour votre contribution à ce travail.

A l'équipe du service MTPH

Vous avez contribué à ce travail. Vos encouragements, votre écoute et votre soutien m'ont été d'une grande aide. Soyez assurés de mon profond attachement.

A l'équipe du laboratoire de physiologie

Vous avez largement contribué à ma formation technique. Merci pour vos conseils.

A l'équipe du CUMA

Vous m'avez fait découvrir le monde de la spectrométrie. Merci pour votre aide, j'espère que nous mènerons à bout nos projets communs.

A mon époux Lionel et mes enfants Maxime, Louis et Lily

Merci pour l'amour et le bonheur que vous me donnez tous les jours. Merci pour votre indulgence et votre soutien. Mon amour pour vous est inconditionnel.

A mes parents, ma famille...à ceux qui ne sont plus là

Vous m'avez soutenue, encouragée, coachée et avez pris soin de mes enfants. Je vous en suis éternellement reconnaissante et vous aime tendrement.

A mes amis

Vous vous êtes intéressés à mon travail, vous m'avez soutenue, vous avez compris et pardonné mes absences. Soyez assurés de mon amitié sincère.

Sommaire

I.	Introduction, état de l'art et objectifs	2
I.1	Introduction	2
I.2	État de l'art	5
I.2.1	Le Biomarqueur	5
I.2.2	Fraction exhalée du NO (FeNO)	6
I.2.3	L'étude des expectorations induites	8
I.2.4	Méthode des condensats de l'air exhalé (EBC)	11
I.3	Objectifs	16
II.	Partie 1 : Méthodologie de l'étude des condensats de l'air exhalé (EBC) ...	17
II.1	Recueil des EBC	17
II.1.1	Étude de différents modes de recueil	18
II.1.2	Standardisation du recueil des EBC par le dispositif EcoScreen	24
II.2	Validation de l'analyse des biomarqueurs	27
II.2.1	Matériel et méthode	27
II.2.2	Dosage des protéines dans les EBC	30
II.2.3	Oxydes d'azotes (NOx)	35
II.2.4	8-isoprostane	41
II.2.5	Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	46
II.2.6	Malondialdéhyde (MDA)	52
II.2.7	Dosage des cytokines	56
II.2.8	Marqueurs d'exposition professionnelle dans les EBC	58
II.2.9	Conclusion sur la standardisation méthodologique du recueil du condensat à l'analyse	60
III.	Partie 2 : Étude clinique	61
III.1	Introduction	61
III.2	Matériel et Méthode	62
III.2.1	Population	62
III.2.2	Questionnaire	63
III.2.3	EFR	66
III.2.4	Mesure de la fraction exhalée du NO (FeNO)	66
III.2.5	Recueil du condensat	67
III.2.6	Analyse des biomarqueurs	67
III.2.7	Statistiques	69
III.3	Résultats	70
III.3.1	Caractéristiques générales	70
III.3.2	Niveaux des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé	74
	Tableau de synthèse	100
IV.	Discussion	101
V.	Conclusion et Perspectives	111
	Références	115

I. Introduction, état de l'art et objectifs

I.1 Introduction

La voie de pénétration des toxiques ou allergènes environnementaux et professionnels est principalement aérienne et provoque des pathologies respiratoires telles que l'asthme, la BPCO ou les pneumoconioses. L'évaluation et le suivi de ces pathologies par des tests respiratoires et par l'imagerie est actuellement indirecte. Ces examens mettent en évidence, parfois tardivement, les conséquences de ces expositions. La surveillance médicale des salariés se justifie notamment dans un but de prévention et de détection de la nocivité d'une telle exposition et ce, le plus précocement possible afin de mettre en œuvre les mesures nécessaires pour éviter la pathologie ou son aggravation. Dans ce contexte, un accès direct à la pathogénèse par l'évaluation de biomarqueurs est important pour estimer le degré d'atteinte de l'organisme avant l'apparition des effets cliniques.

L'analyse du liquide de lavage broncho alvéolaire (LBA) est une technique de référence d'étude directe du poumon mais n'a que quelques indications cliniques du fait de son caractère invasif. De plus, le lavage au sérum physiologique est sélectif d'une partie des voies aériennes et l'analyse est principalement cytologique (1).

L'inflammation est un phénomène qui met en jeu des médiateurs qui initient, amplifient ou chronicisent cet état par une activation cellulaire. Les cytokines, certaines protéines et les dérivés de l'acide arachidonique font partie de ces médiateurs. Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres (ROS) (peroxyde d'hydrogène, produits de la peroxydation lipidique, oxydes d'azote) et d'antioxydants. Ces ROS peuvent être responsables de l'apoptose cellulaire. Au cours de la pathologie pulmonaire, ces phénomènes

d'inflammation et de stress oxydant peuvent coexister et interagir (2–4). L'étude directe et non invasive de ces phénomènes dans l'air exhalé est séduisante pour l'évaluation ou le suivi des atteintes pulmonaires (5–7).

Certaines méthodes d'étude directe moins invasives de l'atteinte pulmonaire sont actuellement validées, telles que la mesure de la fraction exhalée du NO (FeNO) (8–10) ou l'étude de la cellularité dans les expectorations induites (IS) (11). La méthode des condensats de l'air exhalé (EBC), en cours de standardisation, fait l'objet d'un intérêt scientifique croissant depuis le début des années 90 (5,12).

Ces trois méthodes permettent l'étude de biomarqueurs témoignant de l'atteinte pulmonaire qui peut être préclinique. Les marqueurs étudiés sont des produits de l'inflammation tels que le FeNO et les cytokines ainsi que des produits du stress oxydant incluant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les produits de peroxydation lipidique (8-Isoprostane, malondialdéhyde), les oxydes d'azote (nitrates, nitrites) et les produits du stress nitrosant (ion peroxy-nitrique, 3-nitrotyrosine). Des marqueurs d'exposition pulmonaire tels que les métaux lourds et certains minéraux ont également été étudiés dans les condensats de l'air exhalé (13–17).

La constitution de références méthodologiques pour le recueil, le stockage et l'analyse des EBC ont été initiées en 2005 (3). Depuis, l'utilisation de cette méthode dans des études cliniques est publiée de manière exponentielle. La revue de ces études révèle cependant une variabilité importante des dosages qui rend difficile leur comparaison. Ce constat confirme la nécessité de standardiser et de valider la méthode des EBC. Cette exigence méthodologique est incontournable pour permettre le développement clinique de cette approche. Les écueils existent à chaque étape, du recueil de l'EBC à l'analyse des biomarqueurs qu'il contient

(18,19). Une attention particulière doit être portée sur le choix du matériel de recueil, l'optimisation de la récupération des biomarqueurs qui peuvent être piégés sur ce matériel, le débit ventilatoire pendant le recueil et sa durée. Les techniques de dosage doivent être à la fois sensibles et spécifiques mais également adaptées à ce nouveau liquide biologique. Les études cliniques sur des sujets sains et porteurs de pathologies pulmonaires reposant sur une méthodologie validée sont encore nécessaires pour standardiser cette approche et connaître les valeurs de référence. Cette étape est un préalable nécessaire avant la réalisation d'études épidémiologiques en rapport avec l'exposition à des toxiques environnementaux ou professionnels qui est l'objectif final de notre recherche.

Ce travail s'inscrit dans ce contexte et a pour objectif principal la standardisation et la validation de la méthode des EBC en tenant compte des difficultés méthodologiques liées à ce nouveau liquide biologique. Dans un second temps, nous avons détecté et quantifié les biomarqueurs validés sur une population de sujets sains et porteurs de pathologies pulmonaires telles que l'asthme, la BPCO, la pneumopathie interstitielle diffuse et la sclérodermie. Ce travail a pour objectif secondaire l'analyse des niveaux de biomarqueurs en regard de ces pathologies et de leurs spécificités. Ces travaux entrent dans le thème de recherche des marqueurs de l'inflammation liés aux nuisances respiratoires professionnelles ou environnementales, qui est un des axes de l'EA 4483.

1.2 État de l'art

1.2.1 Le Biomarqueur

Un biomarqueur de l'inflammation pulmonaire est une substance résultant d'une activité biologique qui peut témoigner, lorsque sa production est exagérée, de phénomènes pathologiques tels que l'inflammation ou le stress oxydant. Dans ce cadre, la production de radicaux libres (ROS) peut altérer les macromolécules constituant les cellules telles que les phospholipides, les protéines, les enzymes ou l'ADN affectant ainsi leur physiologie susceptible d'engendrer leur mort. Cette oxydation est en principe régulée par l'activité anti-oxydante mais cet équilibre peut être perturbé lors de pathologies ou en réaction aux expositions à différents toxiques (2). Les produits du stress oxydant incluent le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les produits de peroxydation lipidique (8-Isoprostane, malondialdéhyde), le monoxyde d'azote (NO) et ses produits d'oxydation tels que les oxydes d'azote (nitrates, nitrites) et les produits du stress nitrosant (ion peroxy-nitrique, 3 nitrotyrosine). L'inflammation, quant à elle, implique d'autres médiateurs tels que les cytokines, certaines protéines et les dérivés de l'acide arachidonique qui initient, amplifient ou prolongent la réponse inflammatoire en rapport avec une agression de l'organisme.

Les phénomènes inflammatoires et oxydatifs sont liés et coexistent lors des atteintes pulmonaires. Ainsi, l'étude directe dans l'air exhalé de ces biomarqueurs qui peuvent être présents au niveau du poumon sous forme volatile ou hydrosoluble apparaît séduisante pour l'évaluation et le suivi de populations du fait d'une exposition à des toxiques environnementaux ou professionnels. Les composés volatils sont étudiés directement dans l'air exhalé, c'est le cas par exemple du NO

exhalé. Les composés non ou partiellement volatils peuvent être étudiés dans les expectorations induites (EI) et les condensats de l'air exhalé (EBC).

1.2.2 Fraction exhalée du NO (FeNO)

Le NO exhalé (FeNO) dont la mesure est aujourd'hui bien standardisée, est un biomarqueur volatil permettant l'évaluation de l'inflammation des voies bronchiques (9). Sa formation est dépendante des NO synthases (NOs). Ces dernières sont responsables de l'augmentation du NO exhalé observée au cours de certaines pathologies inflammatoires broncho-pulmonaires. Dans l'asthme, il est considéré comme un marqueur de l'inflammation éosinophile (20). Son rôle est important lors de l'inflammation aiguë notamment dans l'asthme allergique. L'activation cellulaire avec la production de cytokines pro-inflammatoires va activer les NOs inducibles (iNOs) qui ont une capacité de production de NO supérieure par rapport à celle des NOs constitutives (cNOs). Le NO étant à la fois vaso et bronchodilatateur, ce mécanisme vise à augmenter ou maintenir le rapport ventilation-perfusion. Lors de l'inflammation chronique, un rétrocontrôle sur l'activation de ces iNOs va s'effectuer par la production de cytokines telles que l'IL1 β , le TNF α et le MIP α via l'activation du facteur de transcription NF-KappaB (21,22).

Bien que non spécifique, ce biomarqueur est de plus en plus utilisé en pratique clinique pour l'orientation diagnostique et la surveillance respiratoire de patients asthmatiques car il apparaît plus précoce et plus sensible que les tests conventionnels (spirométrie) (9,23). Sa variation est en rapport avec l'exposition chez des salariés exposés à des nuisances respiratoires et peut permettre d'orienter vers l'origine professionnelle d'une sensibilité spécifique. Elle permet également d'évaluer l'efficacité des mesures de prévention ou des traitements mis en œuvre (24). Ainsi,

on retrouve des niveaux élevés de FeNO chez des patients sensibilisés de 24 à 48h après des tests de provocation aux isocyanates et au latex ou encore chez des travailleurs sensibilisés tels que les boulangers, fermiers, coiffeuses, personnels de santé ou régulièrement au contact d'animaux de laboratoire (20,21,25–28). Certains auteurs ont trouvé une élévation du FeNO associée à l'augmentation de l'hyperréactivité bronchique chez des maîtres nageurs (29).

Les concentrations de FeNO sont habituellement mesurées avec un analyseur de NO en chimiluminescence. Le développement d'appareils de mesure portatifs favorise le suivi de populations exposées au sein même de l'entreprise, même si la fiabilité de ces dispositifs peut être mise en cause.

Chez le sujet sain, la quantité de NO mesurée dans l'air exhalé varie entre 4 et 20ppb (1). La collaboration de l'American Thoracic Society (ATS) et de l'European Respiratory Society (ERS) a permis la publication de recommandations pour la mesure du NO exhalé en 2005 (8) et son interprétation clinique en 2011 (9). Des valeurs seuils ont été proposées à 25 et 50ppb chez les patients asthmatiques. Au delà de 50ppb, une inflammation de type éosinophile est probable et une bonne réponse au traitement corticoïde inhalé est attendue alors que ce traitement sera peu efficace en dessous de 25ppb. Concernant le suivi, les recommandations indiquent une diminution ou une augmentation significative du FeNO lorsque la variation est au moins égale à 20% au-delà de 50ppb ou 10ppb en dessous de 50ppb. En pratique, le sujet debout effectue une inspiration profonde d'air filtré sans NO avant d'expirer à débit constant. Un indicateur visuel indique la stabilité du débit expiratoire. Le NO exhalé est ainsi mesuré directement (mesure dite «on-line») lors de l'obtention d'un plateau d'au moins 3 secondes correspondant à une variation inférieure à 10% ou 1ppb. Trois mesures reproductibles (variation < à 10%) sont nécessaires pour valider

la mesure. Une mesure est réalisée sur quatre débits différents. Les valeurs des différents débits ont pour certains auteurs permis la création de modèles permettant d'évaluer le lieu de production du NO. Le modèle à deux compartiments de Tsoukias évalue le NO bronchique et le NO alvéolaire (30) et plus récemment le modèle à trois compartiments évalue le NO alvéolaire, bronchique et les diffusions du NO bronchique (31).

La reproductibilité de la méthode a fait l'objet dans notre laboratoire, d'une étude dans laquelle deux mesures de NO le matin et deux mesures l'après midi ont été effectuées sur 31 témoins, avec des coefficients de corrélation intra classe ≥ 0.98 (32).

La mesure du FeNO est souvent associée à la mesure d'autres biomarqueurs non volatils de l'inflammation et du stress oxydant dans les condensats de l'air exhalé. Cette double approche permet une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'asthme mais surtout sa détection plus précoce et constitue une aide dans la surveillance de sa prise en charge (33).

1.2.3 L'étude des expectorations induites

Les premières recommandations concernant les expectorations induites (EI) sont apparues en 2002 (11). Leur recueil s'effectue après inhalation de sérum salé hypertonique induisant une expectoration qui refléterait la composition de la partie proximale de l'arbre bronchique (34). Ce recueil d'EI peut être analysé par immunocytochimie ou fluorométrie pour la détermination de la cellularité comme dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et pour la détermination d'autres composés hydrosolubles pulmonaires.

Cette méthode a été utilisée chez des salariés exposés à l'amiante mais elle est principalement utilisée chez les patients asthmatiques ou atteints de BPCO (6,34) pour lesquels l'étude de la cellularité est réalisée. Son intérêt pour la quantification de corps asbestosiques a été étudiée en 1998 par un groupe de travail de l'ERS qui a conclu à une grande spécificité mais une sensibilité trop faible par rapport à l'étude des corps asbestosiques dans le LBA (35–37). Concernant l'asthme professionnel, certaines équipes ont étudié plus particulièrement l'exposition professionnelle à des agents sensibilisants de haut et bas poids moléculaires (céréales, farines, champignons, isocyanates, acrylates, cèdre rouge, bois exotiques, persulfate, manganèse ou styrène) (38). Une augmentation des cellules éosinophiles variant selon les auteurs de plus de 2,5 à 3% est habituellement retrouvée en cas de sensibilisation (33,38). Ces tests de provocations spécifiques effectués en laboratoire sont rarement réalisés directement sur le lieu de travail car ils exposent à un risque modéré mais non négligeable de bronchospasme lors de l'induction (39). Ces tests ne prennent donc pas en compte l'exposition globale et réelle du salarié.

Les biomarqueurs de l'inflammation et du stress oxydant ont été étudiés dans les EI tels que les cytokines, les eicosanoïdes ou les produits de peroxydation lipidique (40,41). Des problèmes de dilution encore non résolus ainsi que la possible interférence avec des agents mucolytiques utilisés lors de la préparation des expectorations, rendent ces dosages difficiles en routine (6). De plus, pour certains auteurs, cette méthode induit une inflammation ne permettant pas sa réalisation répétée sans le risque d'influencer les résultats (42).

Ces arguments permettent de conclure à l'intérêt de l'étude des EI en laboratoire et notamment lors des tests de provocation aux allergènes professionnels par l'étude de la cellularité. L'étude des EI nécessite l'inhalation préalable au recueil d'un

aérosol de sérum physiologique et doit être analysée dans les 2 heures suivant le recueil (34). Le bronchospasme, qui peut être induit lors de son recueil, limite les indications de cette méthode, en particulier chez les patients asthmatiques et BPCO. Ces contraintes expliquent que son utilisation soit essentiellement clinique et difficilement réalisable sur le lieu de travail ou au domicile (39). Ceci est peu compatible avec les études épidémiologiques professionnelles ou environnementales ou avec un suivi régulier de salariés exposés.

1.2.4 Méthode des condensats de l'air exhalé (EBC)

La méthode des condensats de l'air exhalé est une méthode totalement non invasive et par conséquent utilisable pour le suivi régulier des patients ou de sujets exposés à des toxiques professionnels ou environnementaux (6,43). Le liquide de revêtement des voies aériennes est aérosolisé puis transporté dans l'arbre bronchique. Lors d'une respiration calme, la concentration de l'aérosol est comprise entre 0.1 et 4 particules/cm³ avec un diamètre moyen inférieur à 0.3µm (5,44,45). Dans le cadre de la méthode des EBC, cet aérosol mélangé à la vapeur d'eau des voies aériennes est recueilli par refroidissement de l'air exhalé. Ces condensats ainsi composés à 99.9% de vapeur d'eau contiennent des gouttelettes du liquide de revêtement épithélial des voies aériennes (ALF) dans lequel se trouvent des composés non ou partiellement volatils hydrosolubles (3). Leur dosage chez des patients ou chez des salariés exposés à des nuisances respiratoires peut témoigner d'une inflammation ou du stress oxydant pulmonaire.

1.2.4.1 Origine de formation des EBC

Le mécanisme précis de formation des aérosols contenus dans les EBC est encore en cours d'étude mais deux hypothèses sont explorées.

La première hypothèse explique l'aérosolisation du liquide qui revêt les voies aériennes (airway lining fluid ou ALF) par la turbulence de l'air dans l'arbre bronchique lors de l'inspiration et de l'expiration. Les mouvements sont de type brownien au niveau des voies aériennes proximales du fait d'un calibre plus important pour devenir laminaires au niveau des voies aériennes distales. La viscosité de l'ALF se modifie le long de cet arbre bronchique rendant l'aérosolisation optimale au niveau des petites voies aériennes (5).

La seconde hypothèse connue sous le terme de model BFFB (Bronchiole Fluid Film Burst) explique l'aérosolisation du liquide de revêtement des voies aériennes par la rupture du film liquidien formé lors de la réouverture des bronchioles respiratoires lors de l'inspiration (46,47). L'expiration amène cet aérosol vers les voies aériennes supérieures (cf. Figure 1 ci-dessous).

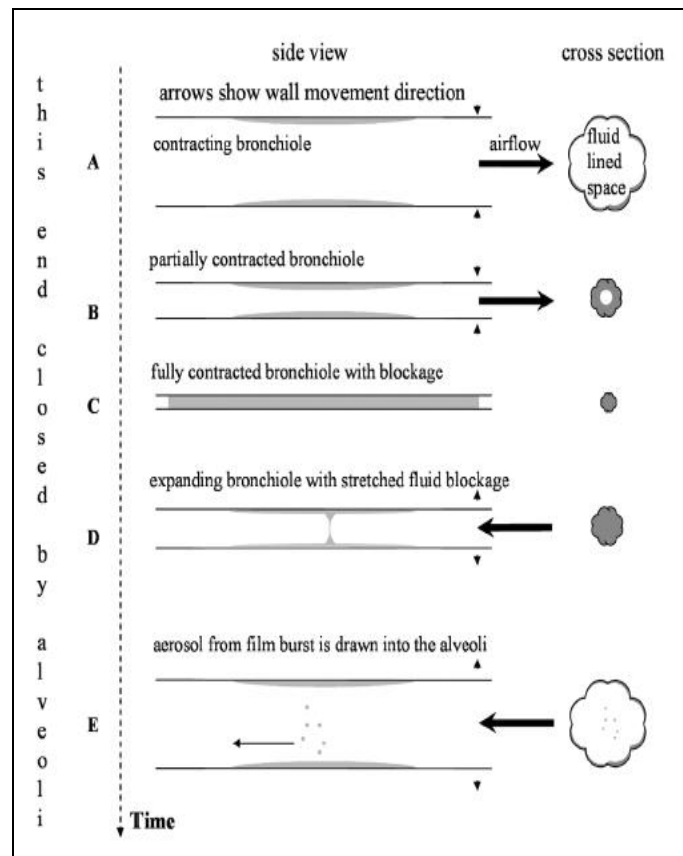


Figure 1. Illustration du model BFFB lors de l'expiration (A,B) et l'inspiration (D,E) (Johnson and Morawska, 2009)

Cette théorie a récemment été étayée par Johnson et Morawska (46) qui démontre une décroissance de la taille et du diamètre des particules dans l'air exhalé après une période d'apnée. Ceci est expliqué par une décantation gravitationnelle de l'aérosol formé dans les espaces alvéolaires. Dans cette étude, l'expiration profonde et l'inspiration rapide augmente la concentration de l'aérosol dans l'air exhalé alors que l'expiration rapide a peu d'effet sur la concentration mesurée. Ce dernier élément va à l'encontre de la première hypothèse qui voudrait que l'augmentation de la

vitesse inspiratoire et expiratoire augmente la concentration de particules exhalées du fait de l'augmentation de la turbulence de l'air. Ceci n'est pas non plus démontré par l'étude de Debley *et al* qui concluent à une formation des gouttelettes proportionnelles aux débits ventilatoires, mais que l'augmentation du volume des EBC n'augmente pas la dilution mesurée par conductimétrie et ne diminue pas non plus le niveau des biomarqueurs dans les EBC (48). De plus, dans cette même étude, l'augmentation de la turbulence de l'air par bronchoconstriction induite n'augmentait pas le volume d'EBC ni le niveau des biomarqueurs. Rosias *et al* retrouvaient également des niveaux de biomarqueurs identiques sur un volume d'EBC différent du fait de l'utilisation de différents condenseurs (49). Almstrand *et al* ont montré la présence de liquide et protéine du surfactant dans les EBC confirmant l'origine pulmonaire profonde des particules (50).

1.2.4.2 Revue des différentes méthodes de recueil

Les premières recommandations de l'ERS/ATS ont été publiées en 2005 (3). Différents dispositifs de recueil ont été décrits allant du plus artisanal (tube en verre ou en silicone plongé dans la glace) au plus commercial (Turbo DECCS, R-Tube ou EcoScreen) (19). Les dispositifs de recueil sont multiples mais le principe est le même à savoir, refroidir de l'air exhalé afin de former de la condensation qui est recueillie, aliquotée et analysée, soit directement pour les biomarqueurs les moins stables (H_2O_2), soit après stockage à $-80^{\circ}C$. La congélation permet de différer le dosage de plusieurs semaines. La quantité de condensat recueilli dépend du système choisi. Elle est en moyenne de 1 à 2 millilitres pour 100 litres d'air expiré lors d'une respiration calme (51). Les condenseurs utilisés peuvent être électriques nécessitant un local adapté. Ils peuvent également être mécaniques avec l'utilisation

de glaçons ou d'un manchon réfrigéré comme pour le dispositif à usage unique R-
Tube qui peut être utilisé au domicile des patients. Ce dispositif est donc bien adapté
aux études épidémiologiques. A noter qu'il existe également des dispositifs capables
de recueillir les condensats chez l'animal (52,53).

Les matériaux constituant le dispositif sont importants (54). Il peut s'agir de verre,
de silicone, de polypropylène (Turbo-DECCS,) ou de téflon (EcoScreen). Un agent
recouvrant ou «coatant» le dispositif de recueil peut optimiser la récupération des
biomarqueurs dans les EBC en limitant leur adhésion (54,55). Le choix du dispositif
et de l'agent coatant est primordial et constitue un des écueils méthodologiques pour
la standardisation des EBC (18).

1.2.4.3 Revue des différents biomarqueurs dosés dans les EBC

Les biomarqueurs pulmonaires de l'inflammation et du stress oxydant étudiés
dans les EBC sont hydrosolubles et non ou partiellement volatils. Concernant le
stress oxydatif, il s'agit de produits d'oxydation de l'eau formant le peroxyde
d'hydrogène (H_2O_2) (56), des lipides insaturés formant les eicosanoïdes
(leucotrienes, prostaglandines et isoprostanes) (57), des lipides polyinsaturés
formant les aldéhydes (malondialdehyde) ainsi que les dérivés d'oxydation du NO
tels que les nitrites, nitrates, l'ion peroxy-nitrique qui peut oxyder les acides aminés
pour former la 3 nitrotyrosine ou former des nitrosothiols avec le glutathion et la
cystéine (58).

Concernant les dérivés de l'inflammation, les biomarqueurs étudiés dans les EBC
sont les cytokines (59) et les eicosanoïdes précédemment cités.

Le dosage des protéines totales est également étudié et correspond pour certains auteurs à un marqueur de l'inflammation. Pour d'autres, il s'agit d'un bon témoin de la dilution des EBC (59,60).

La difficulté majeure de ces dosages, qui sont par ailleurs bien maîtrisés dans des liquides biologiques classiques comme le sang ou le sérum, réside dans la valeur des taux attendus de biomarqueurs très proche des limites de détection des techniques utilisées. Une partie importante de notre recherche est d'adapter ces techniques à cette nouvelle matrice qu'est le condensat.

Les études publiées depuis les dernières recommandations méthodologiques en 2005 utilisent des méthodes d'analyses différentes avec une reproductibilité souvent non étudiée. Ceci constitue un autre écueil méthodologique pour la standardisation des EBC, et rend difficile la comparaison des niveaux de biomarqueur entre les études et la constitution de valeurs de référence chez les témoins (61).

1.3 Objectifs

L'objectif principal de notre recherche est, dans un premier temps, la standardisation et la validation méthodologique du recueil des EBC et du dosage des biomarqueurs de l'inflammation et du stress oxydant qu'il contient. Ce travail sera présenté dans une première partie méthodologique.

Nous avons voulu dans un second temps détecter et quantifier ces biomarqueurs dans une population d'adultes atteints de pathologies pulmonaires telles que l'asthme, la BPCO, la pneumopathie interstitielle diffuse ou la sclérodermie et dans une population de témoins fumeurs et non fumeurs. Cette étude clinique sera présentée dans la seconde partie de ce manuscrit.

L'objectif secondaire est la comparaison des niveaux de biomarqueurs dosés dans les EBC et du FeNO chez les sujets malades par rapport aux témoins.

II. Partie 1 : Méthodologie de l'étude des condensats de l'air exhalé (EBC)

L'objectif principal de notre étude est la validation méthodologique et la standardisation du recueil des condensats de l'air exhalé (EBC) et des procédures d'analyses biologiques de ce condensat. Il s'agit de définir le dispositif de condensation que nous allons utiliser et de définir un protocole standardisé du recueil en terme de temps ou de volume total exhalé, mais également en terme de préparation et nettoyage de l'équipement. Le condensat recueilli fait ensuite l'objet d'analyses. Nous avons choisi puis validé ces techniques de dosage par des tests de reproductibilité. La conservation des biomarqueurs dans l'EBC a fait l'objet de tests de stabilité.

II.1 Recueil des EBC

Le recueil des EBC peut être réalisé par plusieurs dispositifs constitués de matériaux différents. Le choix du dispositif est important et doit permettre la récupération optimale des biomarqueurs dans les condensats de l'air exhalé qu'il collecte. Le système de refroidissement permettant la condensation peut être mécanique, comme un manchon réfrigéré dans le cas du R-Tube, ou électrique avec une température qui peut être réglée de 0°C à -4°C (Turbo-DECCS) ou fixe à -20°C (EcoScreen). Le recueil peut être standardisé sur le temps ou sur le volume total expiré avec un débit expiratoire qui peut être spontané ou accéléré. Les volumes obtenus seront différents en fonction du dispositif, du temps d'expiration ou du volume d'air exhalé total. Enfin, la récupération des biomarqueurs lors du recueil peut

être encore optimisée par le recouvrement ou «coating» du dispositif avec un agent «coatant». Chacun de ces points est évalué dans notre étude permettant de standardiser le recueil.

II.1.1 Étude de différents modes de recueil

Nous avons testé les trois dispositifs les plus couramment utilisés afin de déterminer celui qui sera le mieux adapté à notre étude qui nécessite une quantité importante d'EBC. Nous avons étudié et comparé la détectabilité, les valeurs, la reproductibilité intra assay et inter jour des variables d'EBC.

II.1.1.1 Matériels et méthodes

L'EcoScreen (Jaeger) (**Figures 2 et 5**) est composé d'une valve double voie anti retour sur lequel s'adapte une lamelle en téflon au bout de laquelle se situe la cupule de recueil en polypropylène. La valve est dotée d'un piège à salive. Le dispositif (lamelle + cupule) est inséré dans un condenseur électrique cylindrique dont la température est fixée à -20°C.

Le dispositif Turbo-DECCS (Medivac) (**Figures 4 et 7**) possède également une valve double voie raccordée par un tuyau semi rigide à un tube en polypropylène de 50 ml de type Falcon inséré dans un condenseur électrique. La température de refroidissement est réglable et fixée à -4°C selon les recommandations du constructeur.

Le R-Tube (Respiratory Research. Inc.) (**Figures 3 et 6**) est un dispositif portable, qui se compose d'une valve double voie anti-retour fixée à un tube en polypropylène sur lequel s'enfile un manchon métallique qui a préalablement été refroidi dans un congélateur à -20°C.

Pour les 3 dispositifs, le sujet est muni d'un pince-nez et respire calmement selon les recommandations méthodologiques de 2005 (3). L'air exhalé est acheminé au travers de la valve anti-retour vers le dispositif refroidi créant ainsi la condensation qui est recueillie.

La standardisation sur le volume expiré total est préférable selon notre expérience car elle permet la récupération d'une quantité identique de condensat pour un même sujet (62). Cependant, ce volume expiré total est mesuré par un appareil branché en dérivation sur l'EcoScreen et ne peut être utilisé pour les deux autres dispositifs. Pour cette étude, nous avons donc standardisé le recueil sur le temps qui est fixé à 20 minutes afin de recueillir une quantité suffisante d'EBC pour les analyses.

Les trois dispositifs EcoScreen, R-Tube et Turbo-DECCS sont testés consécutivement et dans un ordre aléatoire sur une population de 30 témoins volontaires non fumeurs répartis en 10 groupes de 3 personnes. Parmi ces 30 témoins, 9 ont effectué un recueil de condensat 2 jours consécutifs à la même heure.

Nous avons étudié et comparé les valeurs et la reproductibilité intra assay des variables d'EBC (N=30). Pour comparer la reproductibilité inter jour du volume, du pH ainsi que les niveaux de protéines totales et d'oxydes d'azotes (NOx), nous avons recueilli les EBC sur les 3 appareils pendant 2 jours consécutifs à la même heure (N=9).

La mesure du pH s'effectue au moyen d'une microélectrode avec lecture directe sur pH-mètre ; le dosage des protéines totales est réalisé par la méthode μ BCA et le dosage des NOx par la méthode de Griess. Ces techniques de dosages sont détaillées ultérieurement (cf. §II.2.2.1.3 p32 et §II.2.3.1.2 p37)



Figure 2: EcoScreen

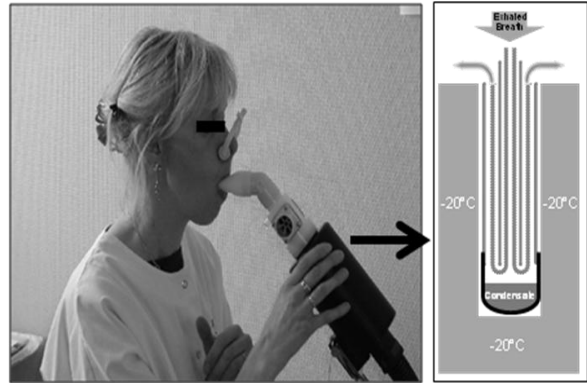
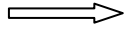


Figure 5: EcoScreen



Figure 3: R Tube

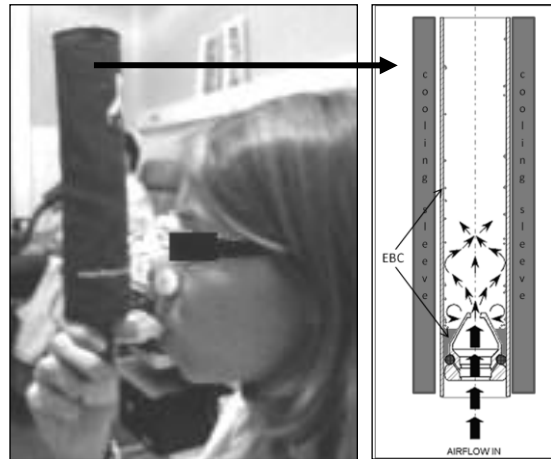
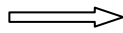


Figure 6: R Tube

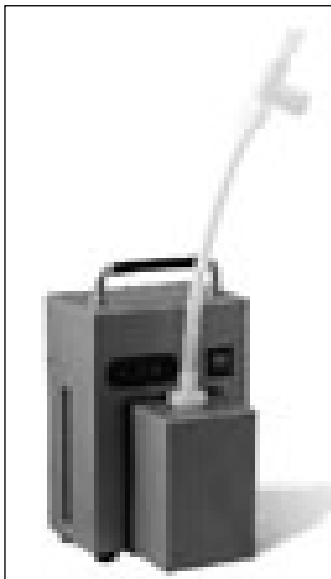


Figure 4: Turbo-DECCS

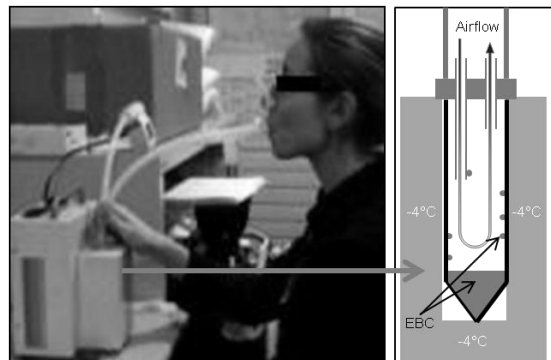
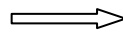


Figure 7: Turbo-DECCS

II.1.1.2 Résultats

Les principaux résultats concernant la comparaison des paramètres mesurés dans les EBC et la comparaison de la variabilité inter-jour sur les 3 dispositifs sont présentés dans les **Tableaux 1 et 2**. L'ordre de passage sur chaque appareil n'a pas d'influence.

Le volume de condensat obtenu avec l'EcoScreen est supérieur et le niveau de pH mesuré dans les condensats est inférieur sur l'EcoScreen par rapport à ceux des 2 autres dispositifs.

Concernant les niveaux de biomarqueurs dosés dans les EBC, il n'y a pas de différence de détectabilité des protéines entre l'EcoScreen (97%), le R-Tube (93%) et le Turbo-DECCS (83%) alors que la détectabilité des NOx est significativement différente entre les 3 appareils (respectivement 97%, 97% et 77%) en défaveur du R-Tube ($p=0.016$). On trouve des niveaux de protéines totales supérieurs pour l'EcoScreen par rapport aux deux autres appareils. Les NOx ont des niveaux différents sur les trois dispositifs, avec des niveaux les plus bas pour le R-Tube et les plus hauts pour l'EcoScreen.

La variabilité inter jour est comparable pour chaque dispositif sauf pour les valeurs de pH, qui est supérieure pour l'EcoScreen même si cette variabilité, inférieure à 5% est tout à fait acceptable.

Tableau 1. Comparaison du volume, du pH et des niveaux de biomarqueurs sur les 3 dispositifs de recueil d'EBC

	EcoScreen n=30	R-Tube n=30	Turbo-DECCS n=30	p**
Volume d'EBC (ml)*	2.8 [2.3 - 3.1]	1.5 [1.3 - 1.8]	1.6 [1.3 - 1.8]	<0.0001 ^{£\$}
pH*	5.85 [5.59- 6.51]	7.45 [7.31 - 7.62]	7.51 [7.31 - 7.68]	<0.0001 ^{£\$}
Protéines totales (µg/ml)*	3.1 [2.4- 4.1]	1.6 [1.1 - 1.7]	1.6 [1.3 - 2.1]	<0.0001 ^{£\$}
NOx (µM)*	21.6 [17.6 - 24.4]	5.2 [3.0 - 7.8]	8.6 [5.6 - 10.3]	<0.0001 ^{£\$\$}

NOx: Oxydes d'azote

* Médiane [Q1-Q3]

** Model linéaire mixte

[£] EcoScreen vs R-Tube

^{\$} EcoScreen vs Turbo-DECCS

^{\$\$} R-Tube vs Turbo-DECCS

Tableau 2. Comparaison de la variabilité inter jour sur les 3 dispositifs de recueil d'EBC 2 jours consécutifs

	EcoScreen n=9	R-Tube n=9	Turbo-DECCS n=9	p**
Volume d'EBC (cv%)*	13.3 [9.6 - 20.9]	13.4 [10.1 - 23.0]	14.2 [8.6 - 18.5]	0.600
pH (cv%)*	4.9 [2.7 - 9.9]	2.6 [2.0 - 3.3]	3.4 [2.3 - 4.1]	0.034 ^{£\$}
Protéines totales (cv%)*	24.4 [18.4- 45.8]	14.8 [9.4 - 49.5]	24.4 [15.8 - 41.2]	0.686
NOx (cv%)*	20.7 [12.8 - 46.5]	19.6 [15.9 - 29.7]	24.5 [15.8 - 48.5]	0.687

NOx: Oxydes d'azote

* Coefficient de variation inter-jour: Médiane [Q1-Q3]

** Model linéaire mixte

[£] EcoScreen vs R-Tube

^{\$} EcoScreen vs Turbo-DECCS

Au total, il n'existe pas de différence de reproductibilité inter-jour entre les trois dispositifs ni d'influence de l'ordre de passage sur chaque dispositif de recueil. Ceci est en faveur d'une stabilité de la production des EBC et de leur composition chez un même individu (63,64).

La comparaison des volumes d'EBC montre un rendement supérieur pour l'EcoScreen. Ces résultats peuvent s'expliquer par la température de condensation qui est plus basse pour l'EcoScreen (-20°C) durant tout le recueil permettant un rendement plus important sur le volume (65). Ceci présente un avantage lors du dosage de plusieurs biomarqueurs nécessitant une plus grande quantité d'EBC surtout quand le dosage est réalisé en «triplicate» comme le suggère les

recommandations (3). Un recueil plus abondant est également utile pour les tests de stabilité dans le temps des dosages de biomarqueurs dans les condensats conservés à -80°C puisque le nombre d'aliquots obtenus lors d'un même recueil détermine la durée et la fréquence de cette étude.

La comparaison de paramètres des EBC obtenus chez 30 témoins sur 3 dispositifs différents montre, pour l'EcoScreen, un pH inférieur contrairement à d'autres équipes ainsi que des niveaux plus élevés de protéines totales et de NOx par rapport aux deux autres dispositifs (65–67). Le niveau des NOx est également plus élevé sur le Turbo-DECCS par rapport au R-Tube. Ces données sont à prendre en compte lors du choix du dispositif en début d'étude. Le R-Tube est adapté aux études épidémiologiques car il s'agit d'un dispositif à usage unique facilement transportable sur lequel on enfile un manchon réfrigéré qui peut être refroidi au congélateur du domicile des sujets inclus. Pour ce qui est de notre travail, nous avons fait le choix de l'EcoScreen du fait des quantités importantes de condensat nécessaires pour les études de reproductibilité et de stabilité des dosages de biomarqueurs dans les EBC. Le rendement plus important sur les biomarqueurs dosés dans cette étude (protéines totales et NOx) est également un argument en faveur de l'EcoScreen.

II.1.2 Standardisation du recueil des EBC par le dispositif EcoScreen

Compte tenu des résultats précédents qui objectivent un rendement supérieur de l'EcoScreen pour le volume recueilli mais également pour les niveaux de protéines totales et de NOx, les condensats de notre recherche sont collectés par le dispositif EcoScreen. Comme le montre la **Figure 8** ci-dessous, le sujet, muni d'un pince-nez, respire calmement au travers d'une valve double voie avec dispositif anti retour. L'air expiré est dirigé vers une lamelle composée d'une matière proche du Téflon introduite dans un condenseur à -20°C. Un piège à salive et la position horizontale de l'embout buccal évitent une contamination salivaire. L'air expiré est isolé puis refroidi à -20°C. La condensation obtenue s'écoule le long de la lamelle pour être collectée dans une cupule en polypropylène.

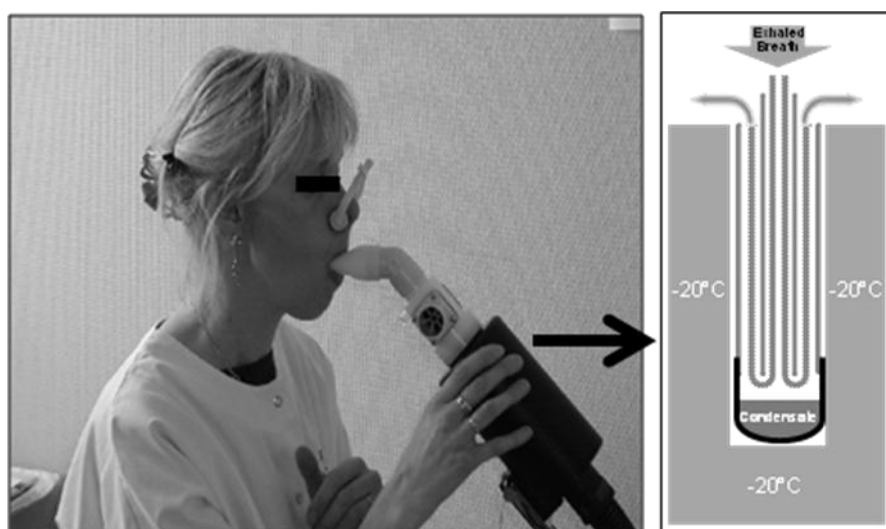


Figure 8: Dispositif EcoScreen (Jaeger)

Un spiromètre électronique (Ecovent, Viasys) est branché sur la valve et permet un enregistrement du volume exhalé total. A 200 litres d'air exhalé, le recueil est terminé et correspond à un volume de liquide de 4.1ml (1.1) en moyenne (écart-type). Les condensats sont, dès le recueil, aliquotés dans des cryotubes et stockés dans un congélateur à -80°C.

L'absence de contamination d'origine salivaire est testée par le dosage de l'activité α -amylasique en colorimétrie cinétique UV. La validation de la méthode est vérifiée avec une limite théorique de détectabilité d'une contamination salivaire à 0,02 μ l de salive pour 500 μ L de condensat (soit une contamination 1/25 000^{ème}).

II.1.2.1 Temps / Volume du recueil

La standardisation du recueil des EBC peut s'effectuer sur un temps déterminé ou sur un volume total expiré. Les études de reproductibilité sur le dosage des biomarqueurs dans les EBC montre une variabilité importante des volumes entre deux recueils lorsque la standardisation est faite sur le temps (68,69). De plus, la fonction respiratoire peut être très altérée chez les patients et cette altération peut être transitoire avec des volumes expirés différents sur plusieurs recueils effectués sur un temps donné. Notre expérience montre chez les témoins que le volume d'EBC après 20 minutes de recueil est variable. Cette variabilité est diminuée lorsqu'on standardise le recueil sur le volume d'air expiré total. Nous avons défini ce volume à 200 litres d'air expiré permettant d'obtenir un volume suffisant d'EBC pour le dosage de la totalité des biomarqueurs. Le temps d'expiration d'un tel volume peut varier selon les personnes de 15 à 40 minutes. Cette standardisation sur le volume expiré plutôt que sur le temps de recueil nous permet d'obtenir des volumes de condensats peu dispersés dans nos populations avec une médiane [IQR] à 4.0mL [3.50- 5.00] chez les témoins versus 4.0mL [3.75-4.50] chez les sujets asthmatiques (p=0.787) dans notre étude publiée en 2011 (62).

II.1.2.2 Coating du matériel de recueil et concentration de l'échantillon

L'intérêt d'utiliser un produit recouvrant ou «coatant» le dispositif de recueil est d'optimiser la détection des biomarqueurs dans les EBC. Deux agents «coatants» ayant une propriété tensio-active (Tween 20, Triton X-100) sont testés afin de déterminer la nature et la concentration du produit retenu au regard de résultats attendus de plusieurs biomarqueurs (recherche d'absence d'interférence sur les dosages à partir de gammes et gain de concentration). L'étape suivante a permis de définir la concentration des bains pour le «coating» de l'ensemble du matériel de recueil afin d'optimiser la récupération des biomarqueurs.

Ces agents «coatants» sont testés en considérant l'impact de la lyophilisation et de la resolubilisation. En effet, pour certains dosages, les niveaux de biomarqueurs sont proches, voire en dessous des limites de détection, et une concentration des échantillons s'est avérée nécessaire. Cette concentration est réalisée par lyophilisation (Heto PowerDry PL9000 Freeze Dryer, Thermo Scientific).

Des tests sont réalisés sur la concentration des protéines obtenues après lyophilisation-resolubilisation d'une gamme de concentrations connues permettant d'objectiver pour le Triton X-100 une excellente récupération des biomarqueurs avec un facteur de concentration moyen (min-max) de 18 (17.2-19.9) pour un facteur attendu de 18.2. Cet agent «coatant» a donc été retenu permettant dans un même temps le nettoyage du matériel de recueil (60).

II.2 Validation de l'analyse des biomarqueurs

II.2.1 Matériel et méthode

Les biomarqueurs étudiés dans les EBC sont les protéines totales, les oxydes d'azotes (NOx), le 8-isoprostane, le peroxyde d'hydrogène, le malondialdéhyde (MDA) et les cytokines. Le choix des techniques de dosage est réalisé selon certains critères définis ci-après. La validation des analyses biochimiques dans les EBC s'effectue avec une méthodologie similaire sur les différents biomarqueurs étudiés. Pour chaque procédure de dosage, nous testons la reproductibilité intra assay sur les échantillons dosés en duplicate. La reproductibilité intra individu est étudiée par le dosage d'EBC recueillis à la même heure sur deux jours consécutifs. La stabilité dans le temps des biomarqueurs est également évaluée.

II.2.1.1 Critères de choix des techniques de dosage

Le choix des techniques de dosage est fait en fonction des critères suivants :

- Prise en compte de la sensibilité théorique (limite de détection) qui doit être inférieure aux valeurs attendues dans les EBC.
- Une prise d'échantillon réduite afin de doser un maximum de biomarqueurs à partir d'un même recueil et d'effectuer ces dosages en duplicate voire triplicate si la prise d'échantillon est faible.
- Un prétraitement de l'échantillon minimum pour éviter la perte ou la formation du biomarqueur d'intérêt dans les EBC. Une concentration de l'échantillon ou un isolement du biomarqueur sont parfois nécessaires.
- La disponibilité et l'accessibilité des techniques de mesure.

- Le coût de l'analyse qui doit être compatible avec une standardisation ;
les dosages peuvent concerner un nombre important de sujets.

La technique de dosage du biomarqueur est testée sur des gammes de concentration connues afin de vérifier les limites de détection (LOD) réelles. Ces gammes sont réalisées dans l'eau ou le diluant propre à la technique, avant d'être testées dans les EBC, afin de vérifier l'absence d'effet matrice défini par l'interférence de ce liquide biologique sur les dosages.

Le taux de détectabilité du biomarqueur est évalué sur les dosages dans nos populations de témoins et correspond à la proportion de condensat ayant un niveau de biomarqueur supérieur à la LOD.

II.2.1.2 Étude de la reproductibilité

La reproductibilité intra assay est testée sur duplicate voire triplicate en fonction de la prise d'échantillon nécessaire pour le dosage. **La reproductibilité intra individu** est testée sur plusieurs jours successifs (reproductibilité inter jour). Ces reproductibilités sont évaluées systématiquement sur des sujets témoins recrutés parmi le personnel de laboratoire ou le personnel hospitalier. Concernant les protéines totales et les oxydes d'azote (NOx) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), cette reproductibilité est représentée par les coefficients de variation (CV) et le coefficient de corrélation intra classe (ICC). La classification retenue est celle de Fermanian (1984). L'ICC apparaît comme excellent de 1.00 à 0.91, bon de 0.90 à 0.71, modéré de 0.70 à 0.51, médiocre de 0.50 à 0.31, et très mauvais de 0.30 à 0. Nous avons également déterminé le biais et le coefficient de répétabilité entre 2 mesures par la méthode de Bland et Altman (70).

II.2.1.3 Étude de la conservation et stabilité des biomarqueurs

Pour répondre à la problématique de la conservation à long terme des biomarqueurs dans le condensat et leur stabilité, nous avons dosé ces biomarqueurs dans des aliquots issus d'un même recueil et conservés à -80°C avant le dosage.

Pour les oxydes d'azote (NOx) et les protéines totales, les dosages sont réalisés après décongélation à 1 jour (J1), 7 jours (J7), 1 mois (M1) 2 mois (M2) et 12 mois (M12) après le recueil. Nous retrouvons une bonne stabilité de 93% pour les NOx et 90% pour les protéines totales. La stabilité après décongélation des NOx est testée sur une conservation à 4°C. Elle est évaluée sur 3 jours successifs. Nous retrouvons une bonne stabilité de 98% des NOx, ce qui est conforme aux résultats d'autres équipes lorsque ces critères ont été publiés (11,21).

Pour l'étude de la conservation du 8-isoprostane, nous trouvons une perte inférieure à 5% sur l'analyse d'un point de gamme préparé à J0 et décongelé à J7, M3 et M12.

Nous avons testé la stabilité à court terme de l'H₂O₂ par le dosage de solution d'H₂O₂ à 3% à 0 (H0) et 2 heures (H2) après conservation à 4°C. La perte d' H₂O₂ n'excède pas 10%. Ce biomarqueur est semi-volatile, ce qui explique sa relative instabilité par rapport aux autres biomarqueurs (61). Ce biomarqueur doit être dosé le plus rapidement possible.

Pour certains biomarqueurs (protéines totales, NOx, 8-isoprostane), nous avons testé les corrélations entre les délais de dosage et les niveaux de biomarqueurs sur une population témoin dont les caractéristiques seront décrites dans la deuxième

partie de ce travail. Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre les délais de dosage et les niveaux de biomarqueurs considérés.

II.2.2 Dosage des protéines dans les EBC

Nous avons étudié la concentration de protéines totales. Son interprétation dans les EBC n'est pas encore clairement définie (59). Pour certains auteurs, il n'y aurait pas de différence significative entre les sujets sains et ceux présentant une affection pulmonaire aiguë (71). Ce biomarqueur permettrait de rapporter certains biomarqueurs aux protéines totales afin de diminuer l'effet de dilution du condensat. D'autres auteurs ont retrouvé une différence significative ($p < 0,05$) des protéines totales entre des fumeurs sains et des non fumeurs (72). Dans ce cas, les protéines totales sont considérées comme biomarqueur de l'inflammation à part entière.

II.2.2.1 Techniques de dosage évaluées

Trois méthodes sont testées en partenariat avec le département de physiologie de la faculté de Médecine de Lille. Il s'agit des méthodes **Bradford**, **BCA** (acide bicinchoninique) et **μ BCA** (qui est une méthode BCA plus sensible). Le choix de la technique de dosage est défini après avoir testé les trois techniques. Les tests de détectabilité, de reproductibilité intra assay et inter individu (N=10) et de stabilité sont réalisés sur la technique de dosage finalement retenue.

II.2.2.1.1 Méthode Bradford.

Un millilitre de condensat est lyophilisé puis resolubilisé dans un volume de 55 μ l de tampon phosphate salin (PBS). Le réactif est obtenu par le mélange de bleu de Coomassie G250 (Sigma), d'éthanol absolu, d'acide ortho-phosphorique titré à 85% et

d'eau distillée. Ce mélange est laissé 15 minutes à température ambiante avant d'être filtré sur papier Whatman pendant 3 minutes, le tout à l'abri de la lumière. On ajoute 50µl de l'échantillon à 950µl de réactif. Les densités optiques sont lues par spectrophotométrie (Spectronic Unicam UV500), à 590nm avec comparaison à une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA)

La limite de détection (LOD) est de 20µg/ml. Cette technique peut être sensibilisée en effectuant deux gammes de calibration (5 à 30µg/ml et 30 à 500µg/ml). Compte tenu des concentrations attendues chez les témoins et les malades avec l'utilisation de cette technique, l'usage de 2 gammes de calibration est nécessaire, ce qui n'est ni pertinent ni satisfaisant. Il s'agit d'une méthode très sensible au détergent employé pour la décontamination du dispositif de recueil. De plus, cette méthode apparaît spécifique de certaines protéines mais pas des protéines totales. Pour ces raisons, cette technique peu coûteuse n'est pas retenue pour le dosage des protéines totales dans les condensats de l'air exhalé.

II.2.2.1.2 La méthode BCA

Le principe de cette technique est le suivant : le cuivre Cu⁺⁺ se transforme en cuivre Cu⁺ en présence de liaisons peptidiques des protéines. La réaction utilise l'acide bicinchoninique qui chélate le cuivre sous sa forme monovalente, formant une coloration en violet lue en spectrophotométrie à $\lambda=550\text{nm}$ (Apollo, LB912, Berthold Technologies).

Un millilitre de condensat par sujet est lyophilisé. Le lyophilisat obtenu est resolubilisé dans un volume de 55µl de PBS. 25µL sont repris deux fois avec ajout

du kit (BC Assay Protein Quantitation Small kit, Uptima) dans chaque aliquot pour la réalisation des dosages en duplicate.

Cette méthode permet d'obtenir une meilleure sensibilité avec une LOD à 10µg/ml. Elle apparaît également moins sensible aux produits de «coating» et aux produits de désinfection que la méthode Bradford et permet un dosage d'un spectre protéique plus large (73).

II.2.2.1.3 La méthode µBCA

Les deux méthodes Bradford et BCA nécessitent la concentration de l'échantillon par lyophilisation. L'étape supplémentaire de lyophilisation-resolubilisation a pu être évitée par l'utilisation de la **méthode µBCA** (MicroBC Assay Protein Quantitation Small kit, Uptima) qui est la technique finalement retenue. Elle est également plus sensible avec une LOD à 1µg/ml, permettant le dosage des protéines totales sur condensat brut, décongelé.

II.2.2.2 Reproductibilité

La reproductibilité des dosages de protéines par la méthode μ BCA est réalisée sur 10 sujets témoins volontaires indemnes de pathologie pulmonaire en duplicate pour l'étude de la reproductibilité intra assay, et sur deux jours consécutifs à la même heure pour la reproductibilité intra individu. La détectabilité est de 100% dans cette étude. Les résultats sont présentés ci-après.

La reproductibilité intra assay (**Tableau 3**) effectuée sur les dosages en duplicate retrouve des coefficients de corrélation intra classe à 0.95, excellent selon la classification de Fermanian. Le **Tableau 4** présente la reproductibilité intra individu effectuée sur 2 jours consécutifs. Les coefficients de corrélation intra classe sont modérés. La méthode de Bland et Altman appliquée à la différence des valeurs obtenues sur ces deux études de reproductibilité montre que tous les dosages sont dans les limites d'agrément qui dépendent du coefficient de répétabilité.

Tableau 3. Reproductibilité Intra assay du dosage des protéines totales dans les EBC

	ICC ¹	CVs ²	Coefficient de Répétabilité ³	Biais ³
Protéines totales	0.95	14.8% (14.9)	1.3 μ g/ml	0.32 μ g/ml

¹ Coefficient de corrélation intra classe

² Coefficients de variation: moyenne (Ecart-type)

³ Test de Bland et Altman

Tableau 4. Reproductibilité Intra individu du dosage des protéines totales dans les EBC

	ICC ¹	CVs ²	Coefficient de Répétabilité ³	Biais ³
Protéines totales	0.61	28.0% (19.8)	3.9 μ g/ml	1.0 μ g/ml

¹ Coefficient de corrélation intra classe

² Coefficient de variation : moyenne (Ecart-type)

³ Test de Bland et Altman

II.2.2.3 Conclusion

Dans notre effort de standardisation des dosages des protéines totales dans les EBC, nous avons testé trois techniques. La méthode μ BCA est actuellement utilisée, elle apparaît plus sensible et permet de s'affranchir de la concentration de l'échantillon par lyophilisation. Les dosages sont ainsi effectués sur condensat brut, limitant les manipulations des échantillons et donc la perte potentielle de biomarqueurs. Ces efforts permettent d'obtenir une détectabilité très satisfaisante supérieure à 95% dans notre étude publiée en 2011 (62), elle est de 96.4% dans la population étudiée dans la seconde partie de ce travail (cf. Partie 2 §III.2.1).

Nous avons étudié la reproductibilité intra assay et intra individu de cette technique de dosage. Sa comparaison reste cependant difficile avec les différentes études publiées dans lesquelles les auteurs utilisent différents modes de recueil des EBC ou différentes techniques de dosages. La plupart des études évaluent la reproductibilité intra assay, plus rarement la reproductibilité inter jour et encore moins fréquemment la reproductibilité intra individu sur deux jours consécutifs (61). Dans notre étude, nous montrons une bonne reproductibilité intra assay des protéines totales dans les EBC. Notre reproductibilité intra sujet pour ce biomarqueur est nettement supérieure (CVs=28%) par rapport à l'étude de Chow *et al* qui obtenaient un coefficient de variation moyen de 72.9% (68).

II.2.3 Oxydes d'azotes (NOx)

Les dérivés nitrés sont produits à partir du NO formé à l'occasion d'un processus inflammatoire. Le NO est un composé instable qui réagit en solution aqueuse avec l'oxygène pour former des NOx stables tels que les nitrites (NO_2^-) ou les nitrates (NO_3^-). Sa réaction avec des espèces radicalaires issues du stress oxydant comme l'anion superoxyde forme un anion peroxy-nitrique (ONOO^-) qui peut former des nitrates en présence de nitrites, ou encore interagir avec certains acides aminés formant par exemple la 3-nitrotyrosine. Ce stress nitrosant peut ainsi altérer la fonction de la protéine (74). La production de NOx est donc augmentée à l'occasion d'une inflammation et d'un stress oxydant mais peut varier en fonction de l'atteinte pulmonaire, des traitements administrés (75) et des habitudes tabagiques (76). La technique de dosage la plus utilisée est la méthode colorimétrique de Griess. La simplicité de ce dosage et son faible coût favorise l'analyse de ces biomarqueurs même si les données de la littérature sont contradictoires. Des taux de nitrites élevés sont retrouvés dans les EBC de salariés exposés au chrome lors du chromage électrolytique ou par les fumées de soudage lorsqu'ils sont comparés à des sujets non exposés (77,78). Dans cette dernière étude, les auteurs ont trouvé une augmentation significative des concentrations de nitrites et de nitrates en fin de poste chez les salariés ne portant pas de protection respiratoire. Ces résultats confirment l'importance du port de protection individuelle chez les soudeurs.

Le dosage des NOx associé à d'autres biomarqueurs plus spécifiques peut aider à comprendre les mécanismes physiopathologiques oxydatifs des atteintes pulmonaires (62,64,79).

Le choix de la technique de dosage est défini après avoir testé deux techniques différentes. Les tests de détectabilité, de reproductibilité intra assay et inter individu et de stabilité sont réalisés sur la technique de dosage finalement retenue.

II.2.3.1 Techniques de dosage évaluées

Deux méthodes sont testées en partenariat avec le département de physiologie de la faculté de Médecine de Lille. Il s'agit de la **Méthode de Griess** et la méthode utilisant la **Microélectrode ISO-HNO**.

II.2.3.1.1 Mesure par microélectrode ISO-HNO – Apollo 4000

Cette technique est envisagée afin de fournir des résultats directs ou «on line» pour le clinicien.

Elle nécessite 0.5 millilitres de condensat brut. La mesure des nitrites se fait au moyen d'une microélectrode (ISO-HNO, WPI). L'analyseur de données est l'appareil Apollo 4000 (WPI). Une cage de Faraday est également nécessaire pour le bon fonctionnement de l'électrode. La calibration de l'électrode à NO s'effectue par ajout d'une quantité connue de KNO_2 titré à $50\mu\text{M}$ dans une solution de $0,1\text{M}$ d' H_2SO_4 et $0,1\text{M}$ de KI.

La méthode consiste à mesurer directement le NO issu de la transformation des nitrites grâce à la microélectrode (ISO-HNO, WPI). Le dosage des nitrites totaux s'effectue après réduction des nitrates en nitrites par le kit (Nitralyser II, WPI). Ces nitrites s'ajoutent aux nitrites déjà présents dans le condensat. La mesure des nitrites totaux correspond donc aux nitrites présents initialement dans le condensat auxquels s'ajoutent les nitrites obtenus après transformation des nitrates.

Le seuil de sensibilité de l'électrode est de 10nM. La limite de détection (LOD) avec le kit (Nitralyser II, WPI) est de 2µM.

Nous avons testé la compatibilité de cette technique avec le condensat par la recherche d'un effet matrice. Le test est effectué chez 10 témoins sur 2 aliquots par sujet. Une concentration connue de NOx est ajoutée de manière aléatoire à l'un des aliquots. L'écart de concentration de NOx entre les 2 aliquots (différence réelle) est comparé avec la concentration connue ajoutée (différence attendue). Il est en moyenne de 3.6% permettant de conclure à l'absence d'effet matrice.

La reproductibilité intra assay est étudiée à partir d'un seul aliquot de 0.5ml de condensat brut. La population est répartie en témoins, asthmes modérés et sévères. La valeur moyenne des NOx est de 56µM avec des valeurs comprises entre 2 et 216µM. La moyenne des coefficients de variation était de 10.9%. Le coefficient de corrélation intra classe est égal à 0.99.

II.2.3.1.2 Méthode de Griess.

Pour notre étude, nous avons choisi la méthode de Griess modifiée (Griess Reagent Kit, Invitrogen) avec détection par spectrophotométrie (Apollo, LB912, Berthold Technologies) car cette technique est utilisée dans la majorité des études publiées avec dosage des NOx. La réaction de Griess permet la mesure des nitrites. Les nitrates sont donc préalablement réduits en nitrites pour être quantifiés. La concentration mesurée représente la somme des nitrites et des nitrates présents initialement dans les EBC. L'étape de réduction est réalisée par une technique enzymatique en tube, utilisant la nitrate réductase (Sigma). La limite de détection est

de 2µM. Le taux de détectabilité dans notre population est de 100% pour les asthmatiques et les témoins.

Lors des tests de reproductibilité intra-individuelle, le coefficient de variation moyen (écart-type) est de 3,1% (2,9%).

II.2.3.2 Reproductibilité

Nous avons retenu la méthode de Griess qui apparaît moins coûteuse en termes de temps et de moyens financiers. La technique utilisant la microélectrode est par ailleurs moins utilisée par les équipes étudiant les NOx dans les condensats. Nos valeurs obtenues avec cette technique sont, de fait, difficilement comparables avec celles d'autres équipes qui utilisent principalement des méthodes colorimétriques (méthode de Griess), fluorométriques, immunoenzymatiques ou encore la chimiluminescence.

La reproductibilité des dosages des NOx par la méthode retenue (méthode de Griess) est étudiée sur 10 sujets témoins volontaires indemnes de pathologie pulmonaire en duplicate pour l'étude de la reproductibilité intra assay, et sur deux jours consécutifs à la même heure pour la reproductibilité intra individu. Les résultats sont présentés ci-après.

La reproductibilité intra assay (**Tableau 5**) effectuée sur les dosages en duplicate retrouve des coefficients de corrélation intra classe excellent selon la classification de Fermanian. Le **Tableau 6** présente la reproductibilité intra individu effectuée sur deux jours consécutifs. Les coefficients de corrélation intra classe sont modérés. La méthode de Bland et Altman appliquée à la différence des valeurs obtenues sur ces deux études de reproductibilité montre que tous les dosages sont dans les limites d'agrément qui dépendent du coefficient de répétabilité.

Tableau 5. Reproductibilité Intra assay

	ICC ¹	CVs ²	Coefficient de Répétabilité ³	Biais ³
NOx	0.99	6.8% (5.4)	1.16µM	0.09 µM

NOx : Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

¹ Coefficient de corrélation intra classe

² Coefficient de variation : moyenne (Ecart-type)

³ Test de Bland et Altman test

Tableau 6. Reproductibilité Intra individu

	ICC ¹	CVs ²	Coefficient de Répétabilité ³	Biais ³
NOx	0.6593	38.8% (23.9)	3.5µM	3.2 µM

NOx : Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

¹ Coefficient de corrélation intra classe

² Coefficient de variation : moyenne (Ecart-type)

³ Test de Bland et Altman

II.2.3.3 Conclusion

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi de privilégier la méthode de Griess, moins coûteuse en réactifs et en temps lorsqu'il s'agit de doser les NOx sur une population plus importante.

En revanche, lors d'une application clinique future, la mise au point et les résultats satisfaisants obtenus pour le dosage des NOx par la Microélectrode ISO-HNO-Apollo 4000 dans des condensats bruts permettent d'envisager la mise à disposition de cet examen non invasif dans le bilan fonctionnel respiratoire des

patients. Cet examen permettrait de donner au clinicien une évaluation directe de l'état oxydatif pulmonaire en complément des données fonctionnelles traditionnelles.

Le dosage des NOx est standardisé et validé par notre équipe avec une détectabilité de 100% dans les études de reproductibilité et clinique. En comparaison de notre travail, un petit nombre d'études a présenté à la fois la reproductibilité intra assay et intra sujet sur les NOx. La comparaison avec ces études reste cependant difficile car les méthodes de recueil et les techniques de dosages (fluorimétrie, méthode immuno-enzymatique) sont différentes.

Nous montrons une reproductibilité intra assay (CVs=6.8%) comparable à celle de l'étude de Ratnavati *et al* ou de Chow *et al* (68,80) qui retrouvent un coefficient de variation moyen respectif de 3.11% et 4.9%. Ces résultats sont meilleurs par rapport à l'étude de Nightingale *et al* (81) qui obtiennent un coefficient de corrélation intra classe à 0.71 sur le dosage des nitrites alors que nous trouvons un coefficient à 0.99 pour les NOx (nitrites + nitrates).

La reproductibilité intra sujet est comparable à celle retrouvée par Chow *et al* qui retrouvent un coefficient de variation moyen similaire (38%) (68). Chladkova *et al* retrouvent sur le dosage des nitrites et nitrates des coefficients de corrélation intra classe respectivement à 0.49 et 0.61 inférieurs au nôtre (0.66), les coefficients de variation moyens pour cette équipe étaient respectivement de 26 et 49% (82).

II.2.4 8-isoprostane

Des isomères des prostaglandines F₂, produits par peroxydation radicalaire de l'acide arachidonique (acide gras polyinsaturé constituant de la membrane cellulaire) sont décrits dans les années 90 comme potentiels marqueurs du stress oxydant (83,84). Avant leur découverte, la mise en évidence du stress oxydant *in vivo* était limitée par l'absence de marqueurs à la fois sensibles et spécifiques. La présence de marqueurs de la peroxydation lipidique dans les pathologies pulmonaires par la méthode des condensats est étudiée par de nombreuses équipes (5,85,86). Actuellement, les deux méthodes de dosage des isoprostanes permettant un dosage sélectif de l'isoforme 8-isoprostaglandine F₂ α qui correspond à l'isoforme la plus abondante et la plus étudiée dans la littérature (86) sont la spectrométrie de masse et la méthode immunoenzymatique (EIA).

La méthode de dosage par spectrométrie peut s'effectuer en phase gazeuse (couplage GC-MS). C'est la méthode de référence actuelle mais elle demande une préparation importante de l'échantillon limitant son utilisation (87–89). La spectrométrie de masse en phase liquide (couplage HPLC-MS/MS) est une technique plus récemment étudiée. A la fois spécifique et sensible, elle nécessite une préparation plus simple de l'échantillon et permettrait l'étude simultanée de plusieurs isoformes du 8-isoprostane (90). L'HPLC-MS/MS est utilisée dans l'étude de condensats de sujets suspects d'allergie professionnelle et retrouve des différences significatives pour les concentrations de 8-isoprostane au décours de tests de bronchoprovocation (91). Une augmentation des concentrations de ce biomarqueur est également retrouvée chez des patients atteints de silicose et d'asbestose comparés aux sujets sains (92–95).

La méthode immunoenzymatique apparaît moins spécifique mais tout aussi sensible (88). Cette technique est par ailleurs la plus simple et la moins coûteuse, ce qui explique son utilisation fréquente par les équipes étudiant ce biomarqueur dans les EBC. Cette méthode est utilisée dans l'étude de condensats de patients asthmatiques (54,55,73,88,96–102), présentant une sarcoïdose (87), une mucoviscidose (88), une BPCO (96,103) une PID (104) ainsi que chez les sujets ventilés (105,106). De même, bien que les fibres d'amiante ne puissent pas être détectées dans les EBC, l'étude des biomarqueurs du stress oxydant peut aider dans la détection préclinique de pathologies associées (107,108). Cette dernière étude a inclu des sujets exposés à l'amiante pour lesquels une étude scanographique était également réalisée. Dans cette étude, les sujets présentant des anomalies subnormales au scanner avaient des niveaux élevés de 8 Isoprostane comparés au groupe non exposé (108). Une étude concernant les travailleurs agricoles a retrouvé une élévation du 8-isoprostane et une corrélation positive avec l'exposition aux poussières de grain et d'endotoxine (109). Une autre étude a rapporté une augmentation précoce du 8 Isoprostane lors d'une exposition aiguë contrôlée à l'ozone (7).

Ces études concernant des sujets atteints de pathologies pulmonaires ou exposés à des toxiques professionnels ou environnementaux retrouvent pour la plupart une augmentation des concentrations de 8 Isoprostane dans les EBC qui est souvent associée à l'étude du FeNO. La plupart des auteurs s'accordent à dire qu'il s'agit d'un marqueur stable, à condition de le stocker à -80°C. Il peut augmenter avec l'âge qui est donc un cofacteur à prendre en compte lors des études (110). Chez les fumeurs, il ne semble pas augmenté (111).

Compte tenu des avantages de ces deux techniques, nous avons évalué la faisabilité de ces analyses dans nos condensats.

II.2.4.1 Techniques de dosage évaluées

Le choix de la technique de dosage est déterminé après avoir testé les deux techniques les plus utilisées (couplage HPLC-MS/MS et méthode immunoenzymatique). Les tests de détectabilité, de reproductibilité (intra assay et inter individu) et de stabilité sont réalisés sur la technique de dosage finalement retenue. Un recrutement de 14 et 5 témoins volontaires sains sont recrutés respectivement pour la reproductibilité intra assay et intra individu.

II.2.4.1.1 HPLC-MS/MS

La mesure des isoprostanes par spectrométrie de masse en phase liquide (HPLC-MS/MS) selon la méthode de Syslova *et al* (93) est développée en collaboration avec l'équipe du Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses (CUMA) de la faculté de pharmacie (Université de Lille 2). Cette méthode est privilégiée dans un premier temps car elle permet le dosage simultané du 8-isoprostane et du Malondialdéhyde (MDA), autre produit de peroxydation lipidique. Cette technique nécessite une extraction en phase solide (SPE C18 1mL Bond Elute) de la molécule avant le dosage. Malheureusement, la mise au point de cette technique n'a pas abouti à ce jour. Si le dosage de gammes de 8-isoprostane réalisées dans l'EBC est possible, sans interférence, avec une LOD de l'ordre de 12pg/mL, la détection de 8-isoprostane est à ce jour de 0% chez des sujets témoins et quelques malades recrutés pour ces tests. Nous avons donc suspendu cette mise

au point au profit de la méthode immunoenzymatique qui est moins spécifique mais tout aussi sensible et largement utilisée.

II.2.4.1.2 Méthode immunoenzymatique (EIA)

Nous avons utilisé le 8-isoprostane EIA kit (Cayman, Interchim) pour le dosage de ce biomarqueur dans notre étude. Le dosage est de type immunoenzymatique par compétition. La lecture des résultats se fait par spectrophotomètre entre 405 et 420 nm (Apollo, LB912, Berthold Technologies). Plus le signal est faible, plus la concentration en 8-isoprostane est élevée. Les données sont analysées à l'aide d'un logiciel du fabricant. Pour diminuer l'effet matrice (interférence entre le kit de dosage et le liquide biologique), nous avons choisi de diluer les échantillons au demi avec le diluant fourni dans le kit. La limite de détection dans notre laboratoire est de 2pg/ml. Le taux de détectabilité est de 100% chez les témoins lors de l'étude de reproductibilité.

II.2.4.2 Reproductibilité

Les tests de reproductibilité intra assay sont effectués par duplicate sur les condensats de 14 sujets témoins. La moyenne des coefficients de variation (écart-type) est de 7.4% (4.8).

La reproductibilité intra individu est étudiée sur un recueil 2 jours successifs à la même heure chez 5 témoins indemnes de pathologie pulmonaire. La moyenne des coefficients de variation (écart-type) est de 39.0% (9.0).

II.2.4.3 Conclusion

La méthode immunoenzymatique apparaît suffisamment sensible pour un dosage sur échantillon brut. Le coefficient de variation moyen de la reproductibilité inter individu (CV=7.4%) est équivalent à celui retrouvés par Leung *et al* en 2006 qui est de 9.7% (0.8–18.8) ou Carpagnano *et al* en 2011 (112,113) inférieur à 10%. La reproductibilité intra individu est importante (CV=39%) en accord avec l'étude de Borrill *et al* ou Kostikas *et al* qui retrouvent une grande variabilité entre les jours avec des niveaux moyens chez les témoins qui restent comparables (114,115). Cette variabilité semble liée à la technique de dosage et peut être diminuée par l'utilisation de l'HPLC-MS/MS (116). Ce biomarqueur apparaît stable avec une perte inférieure à 5% après 1 an de conservation à -80°C (cf. §II.2.1.3).

Le dosage du 8-isoprostane est donc bien validé par notre équipe avec une détectabilité de 100% dans l'étude de reproductibilité et 96% lors de l'étude clinique présentée en seconde partie. Contrairement à certains auteurs, nous n'avons pas retrouvé d'effet âge sur la population témoin de cette étude mais la différence d'âge entre les plus jeunes et les plus âgés est relativement faible (110).

II.2.5 Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est le produit de la transformation par la superoxyde dismutase (SOD) de l'anion superoxyde formé lors d'un stress oxydant qui peut être initié par les cellules inflammatoires. Le dosage de ce biomarqueur doit être réalisé rapidement après le recueil car il est partiellement volatil (61). Des techniques de mesure des niveaux d' H_2O_2 en temps réel existent (EcoCheck) mais doivent être optimisées. Le dosage s'effectue habituellement par des méthodes enzymatiques couplées à la spectrométrie ou la fluorimétrie. Par ces méthodes, une augmentation des niveau d' H_2O_2 est objectivée dans différentes populations de patients asthmatiques (64,117), de patients atteints de BPCO (115) fibrose pulmonaire (104), de sclérodermie (118), de cancer pulmonaire primitif (119) et d'asbestose (120) en comparaison de sujets sains. Chez les patients asthmatiques, une corrélation négative est trouvée entre les valeurs d' H_2O_2 dans l'EBC et le VEMS ainsi qu'avec le débit de pointe (64). Une corrélation positive est également retrouvée entre l' H_2O_2 dans l'EBC, le taux de polynucléaires éosinophiles dans les expectorations induites et l'hyperréactivité bronchique (121). D'autres études ont montré une élévation de l' H_2O_2 chez des sujets ayant une exposition professionnelle ou environnementale tels que les agents d'entretien hospitaliers (122), les soudeurs (123), les salariés exposés au chrome (14), mais également chez des témoins exposés à l'Ozone (7) par rapport aux sujets non exposés. Une méta-analyse récente regroupant 8 études avec un total de 728 patients asthmatiques conclut au caractère prometteur de ce biomarqueur pour la prise en charge de l'asthme même si son rôle exact est encore mal défini (124). L' H_2O_2 est également étudié chez les patients atteints de BPCO (125).

Ainsi, la mesure de l'H₂O₂ et du FeNO apportent des données complémentaires pour le suivi de la pathologie pulmonaire et le suivi de l'efficacité des traitements ou des mesures de prévention mis en place aux postes de travail (126).

II.2.5.1 Techniques de dosage évaluées

Le choix de la technique de dosage dans notre recherche est défini après avoir testé trois techniques différentes. Deux techniques «on-line» sont évaluées dans un premier temps. Ces techniques donnent un résultat directement après le recueil de l'EBC. Les tests de détectabilité, de stabilité, de reproductibilité intra assay (n=8) et inter individu (n=5) sont réalisés sur la technique de dosage finalement retenue.

II.2.5.1.1 Microélectrode HPO – Apollo 4000 (méthode «on line»)

Une première méthode testée utilise une microélectrode. Le principe consiste à mesurer directement ou «on-line» l'H₂O₂ sur condensat frais, par l'utilisation d'une microélectrode spécifique. Il s'agit de mesurer la décroissance de l'H₂O₂ après ajout de catalase (Δ catalase = Δ H₂O₂). Le matériel utilisé est l'Apollo 4000 (WPI, Aston) permettant le recueil et l'analyse des données. Nous avons testé les microélectrodes HPO-2 puis HPO-100 (WPI, Aston). Une cage de Faraday est nécessaire afin d'isoler l'ensemble et de limiter les interférences. La courbe étalon est obtenue par la mesure du courant électrique (ordre de grandeur en pA) lors de l'ajout de concentrations connues et croissantes d'H₂O₂ dans du PBS.

L'électrode HPO-2 est stable mais sa sensibilité est insuffisante au vu des résultats attendus (10-100nM). Nous avons testé la microélectrode HPO-100 qui affichait une sensibilité théorique à 10nM mieux adaptée aux condensats. Malheureusement, nous avons constaté au fur et à mesure des calibrations une

augmentation systématique de la LOD pouvant atteindre un facteur 10 que le constructeur n'a jamais pu expliquer. De plus, malgré la cage de Faraday, un bruit de fond trop important limitait l'interprétation des résultats d' H_2O_2 dans le condensat. La méthode de dosage de l' H_2O_2 par l'appareil Apollo n'a donc pas été retenue.

II.2.5.1.2 EcoCheck (méthode «on line»)

La seconde méthode de dosage «on line» de l' H_2O_2 utilise l'appareil EcoCheck (Jaeger) qui possède une électrode reliée à un ampèremètre très sensible. Cette électrode reçoit les électrons libres produits lors d'une réaction enzymatique d'oxydoréduction de l' H_2O_2 . La LOD théorique est de 30nM avec une gamme pouvant atteindre 3000nM. La prise d'échantillon est de 0.5 millilitre.

L'avantage de cette méthode est le dosage immédiat de l' H_2O_2 après le recueil. Cette méthode associée à la mesure du FeNO a ainsi permis d'objectiver chez une infirmière allergique au latex une élévation de ces biomarqueurs liée au poste de travail permettant de motiver son changement de poste (126).

Cependant, cette technique ne peut s'appliquer en cas de dosage simultané de l' H_2O_2 sur une population plus importante en raison du temps d'analyse nécessaire (un seul échantillon à la fois, sans automatisation, nécessitant la présence du technicien en permanence) et du coût des consommables. De ce fait, nous avons développé la méthode fluorométrique.

II.2.5.1.3 Méthode enzymatique (fluorométrique)

La méthode utilisant l'Amplex red kit (Amplex Red Hydrogen Peroxyde, Invitrogen) permet un dosage en duplicate de l' H_2O_2 à partir de 100 μ L d'EBC brut qui est ajouté à une solution contenant 2U/mL d'enzyme HRP (horseradish peroxidase) et le réactif Amplex red. L' H_2O_2 réagit en présence d'HRP avec ce réactif, produisant la resorufine dont la fluorescence sera mesurée en fluorométrie. La LOD est de 0.081 μ M.

La stabilité de ce biomarqueur est faible du fait de son caractère partiellement volatil. Les études montrent toutefois une stabilité acceptable après conservation à -80°C pendant 3 semaines (64). Nous avons testé la stabilité à court terme par le dosage de solution d' H_2O_2 à 3% à T0 puis après 2h. La perte d' H_2O_2 n'excède pas 10%.

II.2.5.2 Reproductibilité

La reproductibilité intra assay (**Tableau 7**) effectuée sur les dosages en duplicate sur 8 sujets retrouve des coefficients de corrélation intra classe excellent selon la classification de Fermanian. Le **Tableau 8** présente la reproductibilité intra individu effectuée sur 2 jours consécutifs sur 5 sujets. Les coefficients de corrélation intra classe est bon. La méthode de Bland et Altman appliquée à la différence des valeurs obtenues sur ces deux études de reproductibilité montre que tous les dosages sont dans les limites d'agrément qui dépendent du coefficient de répétabilité.

Tableau 7. Reproductibilité Intra assay du dosage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

	ICC ¹	CVs ²	Coefficient de Répétabilité ³	Biais ³
H ₂ O ₂	0.98	7.9% (8.03)	0.039μM	0.008μM

¹ Coefficient de corrélation intra classe

² Coefficients de variation: moyenne (Ecart-type)

³ Test de Bland et Altman

Tableau 8. Reproductibilité Intra individu du dosage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

	ICC ¹	CVs ²	Coefficient de Répétabilité ³	Biais ³
H ₂ O ₂	0.81	16.4 % (18.7)	0.29μM	0.07μg/ml

¹ Coefficient de corrélation intra classe

² Coefficient de variation : moyenne (Ecart-type)

³ Test de Bland et Altman

II.2.5.3 Conclusion

Nous obtenons des coefficients de variation bien inférieurs à ceux de Schleiss *et al* et van Beurden *et al* pour lesquels ce coefficient est supérieur à 40% (127,128). Une reproductibilité satisfaisante est retrouvée par d'autres auteurs (52,115). La technique de dosage de ce biomarqueur est maîtrisée par notre équipe même si les données cliniques sont moins importantes que pour les protéines totales et les NOx du fait de sa mise au point plus tardive. Une étude préliminaire à l'étude clinique (cf.Partie 2) de quelques échantillons (malades et témoins) est réalisée pour ce dosage dans les condensats de notre population mais le taux de détectabilité n'est que de 30.5%, probablement du fait d'un dosage tardif (entre 3 et 6 mois) après le recueil conservé à -80°C. Cette instabilité de l'H₂O₂ est connue et conforte l'intérêt des techniques de dosage «on-line» (61).

II.2.6 Malondialdehyde (MDA)

Parmi les aldéhydes formés lors de la peroxydation lipidique, le plus connu est le Malondialdéhyde (129). C'est le beta-dialdéhyde tricarboné le plus simple, produit lors de la coupure des acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons. Ces acides gras constituent la membrane cellulaire. Le MDA est actuellement le biomarqueur le plus étudié pour déterminer un stress oxydant par son étude dans les tissus mais également sur différents liquides biochimiques tels que le sérum, le plasma, les urines, le LBA et les EBC (130–133). Les méthodes de détermination du MDA peuvent se faire par colorimétrie après réaction avec l'acide thiobarbitutic (TBA) (134). Cette technique semble très critiquée dans la littérature du fait de son manque de spécificité. De plus, elle apparaît peu sensible et peu adaptée à l'étude des condensats de l'air exhalé. La chromatographie en phase liquide couplée à une détection fluorométrique (FD) et utilisant le TBA ou le DNPH comme agent dérivant est également utilisée (130,135,136). La technique à l'heure actuelle la plus spécifique et la plus sensible est la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) (14,16,93,123,131,132,137). En effet, le MDA apparaît comme les autres biomarqueurs à l'état de trace dans le condensat de l'air exhalé et seule, une technique à la fois sensible et spécifique peut permettre l'utilisation en routine de ce dosage.

Le MDA est dosé dans le condensat de l'air exhalé chez des patients asthmatiques (41,130,132,134,135,138,139), BPCO (131) et atteints d'asbestose ou de silicose (93) mais également chez des sujets exposés à certains toxiques environnementaux tels que l'ozone ou les particules de moins de $2.5\mu\text{g}/\text{m}^3$ (130,136) avec une relation entre les taux de MDA, la fonction respiratoire et la pollution ambiante. Les expositions professionnelles aux toxiques sont étudiées tel que le

chrome (14) avec des taux plus élevés de MDA corrélé aux niveaux d'H₂O₂. On retrouve également des taux plus élevés de MDA chez des salariés exposés au cobalt et au tungstène (15), mais pas chez les salariés exposés aux fumées de soudage (123).

II.2.6.1 Techniques de dosage évaluées

Les deux méthodes utilisées pour le dosage du MDA dans les EBC sont testées en partenariat avec le Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses (CUMA) de l'Université Lille 2.

II.2.6.1.1 HPLC-MS/MS selon Andreoli et al., 2003

Nous développons la technique de dosage par spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie en phase liquide (HPLC-MS/MS) sur condensat conservé à -80°C décongelé et dérivé avec du DNPH selon la méthode de Andreoli *et al* (137). La première étape est la mise au point des modalités de dérivation (durée définie à 17h à température ambiante à l'abri de la lumière) ainsi que l'optimisation de l'HPLC (Colonne Supelcosil et pré colonne Supelguard, Sigma Aldrich) et du spectromètre de masse (Api 3000).

L'étape d'optimisation du spectromètre de masse est tout d'abord réalisée avec la Source Turbo Ion Spray (TIS ou ESI) disponible sur le plateau technique. Une manipulation identique réalisée avec la source APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) est utilisée dans l'étude d'Andreoli *et al*. Cette source nous a été prêtée par le constructeur à l'occasion d'un essai et s'avère plus sensible que la source ESI. La limite de détection obtenue se situe entre 2 et 3nM avec la source

ESI. Elle est proche de 1nM avec la source APCI. La limite de quantification (LOQ) était de 10nM avec la source ESI et de 3-5nM avec la source APCI (140).

Un test de reproductibilité intra assay sur des points de concentration de la gamme est réalisé avec chaque source : 5 dosages de 2 points de gamme (5 et 20nM) et 8 dosages du point 10nM pour la source APCI. Pour la source ESI, 5 dosages de la concentration 5nM sont effectués. Les coefficients de variation (CV) sont respectivement pour les niveaux 5, 20 et 10nM à 19.2%, 2.38% et 4.83% pour l'APCI avec des concentrations moyennes à 4.5, 18.6 et 8nM. Pour l'ESI, le CV est à 15.37% pour le point 5nM avec une concentration moyenne à 7.1nM.

L'interférence de la technique de dosage avec le condensat est testée par ajout dosé avec la source TIS (ESI) sur un condensat de témoin en triplicate. Nous ajoutons une concentration de 35nM à un condensat présentant initialement une quantité indétectable de MDA. Le dosage moyen des triplicates est de 31.3nM avec un CV à 10.07%. Ce test était en faveur de l'absence d'effet matrice du condensat sur le dosage du MDA.

La technique de dosage par spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie en phase liquide (HPLC-MS/MS) est donc adaptée au dosage du MDA dans les condensats et la source APCI est la plus sensible mais non disponible. Le dosage du MDA par HPLC-ESI-MS/MS sur une population de témoins retrouve néanmoins une détectabilité insuffisante pour envisager ce dosage sur des populations plus larges. Nous avons suspendu la mise au point du MDA du fait d'un changement structurel du plateau technique universitaire sur le CUMA avec de nouvelles dotations en matériels et notamment un nouveau spectromètre de masse avec source APCI disponible.

Les travaux de Syslova *et al* publiés en 2009 décrivant un dosage simultané du MDA et du 8-isoprostane en HPLC-MS/MS sans dérivation de l'échantillon nous ont incité à développer cette approche (93).

II.2.6.1.2 HPLC-MS/MS selon Syslova *et al.*, 2009

Le dosage du MDA en HPLC-MS/MS selon Syslova *et al* (93) est séduisante du fait de l'absence de dérivation de l'échantillon qui nécessitait une manipulation supplémentaire source de contaminations. Un autre avantage non négligeable de cette méthode est la possibilité de dosage simultané du 8-isoprostane. Cette technique nécessite une concentration de l'échantillon par une extraction en phase solide (SPE C18 1mL Bond Elute) avant le dosage. Malheureusement, la mise au point de cette technique au CUMA de Lille n'a pas abouti. La sortie trop précoce de la molécule en HPLC, du fait d'un faible poids moléculaire du MDA, rend impossible l'individualisation du pic spécifique avec de multiples interférences.

II.2.6.2 Conclusion

Le dosage du MDA n'est pas réalisable à ce jour dans notre établissement. L'utilisation d'un autre spectromètre de masse sélectionnant les molécules selon leur masse exacte est en cours d'étude. La reprise de la première méthode avec une source APCI est également envisagée mais nécessite une nouvelle optimisation du fait du changement de spectromètre.

II.2.7 Dosage des cytokines

Le dosage de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α), chemoattractantes (IL-8) mais également anti-inflammatoires (IL-10) résultant de l'équilibre de la réponse immunitaire TH1/TH2 en rapport avec une agression de l'organisme a fait l'objet d'études cliniques notamment chez les sujets sains fumeurs, asthmatiques (98,130,139,141–143), BPCO (103,144), atteints de mucoviscidose (145) ou de sclérodermie (60). Les techniques utilisées pour le dosage sont principalement des techniques ELISA et des techniques multiplex de cytométrie en flux qui présentent l'avantage d'un dosage simultané de plusieurs cytokines.

II.2.7.1 Techniques de dosage évaluées

Nous avons choisi de développer la technique multiplex qui permet un dosage de plusieurs cytokines simultanément. Ceci permet de définir sur un même échantillon le profil inflammatoire dans le condensat en rapport avec les pathologies étudiées et de pouvoir différencier ces profils d'une pathologie par rapport à une autre.

II.2.7.1.1 Méthode multiplex de cytométrie en flux - Cytometric Bead Array (CBA)

En partenariat avec le service d'immunologie du Centre de Bio-Pathologie du CHRU de Lille, nous avons utilisé la méthode multiplex Cytometric Bead Array (CBA) qui permet le dosage de 6 à 11 cytokines simultanément à partir d'un millilitre de condensat. La sensibilité théorique de cette technique est comparable à celle de l'ELISA, tout en étant très spécifique.

Les dosages sont réalisés sur un millilitre de condensat congelé, concentré par lyophilisation puis resolubilisé dans 55 μ L d'une solution tampon. Cette concentration

est nécessaire du fait de la faible concentration des cytokines à l'état brut, proche voire inférieure aux seuils de détection de la technique (71,73,98,146).

Un cocktail de billes recouvertes chacune d'un anticorps de capture permet le dosage simultané de plusieurs cytokines qui sont révélées par des anticorps secondaires fluorescents. La fluorescence est mesurée par un cytomètre. Les résultats sont exprimés en moyenne de fluorescence (MFI). L'interprétation des moyennes de fluorescence obtenues sur le cytomètre est réalisée grâce au logiciel d'analyse de données adapté au kit de dosage utilisé.

Du fait de la réorganisation du département de biologie, les mises au point sont réalisées sur deux cytomètres avec des résultats différents voire divergents (cytomètre EPICS XL - Beckman Coulter avec le kit 6 plex CBA Human Th1/TH2 cytokines 2 - BD Biosciences et cytomètre Cytomics™ FC500 - Beckman Coulter avec le kit 11 plex CBA FlowCytomix Human Th1/TH2 - Bender MedSystems).

II.2.7.2 Reproductibilité

Sur le premier cytomètre, les tests de faisabilité étaient satisfaisants. Nous avons retrouvé une bonne reproductibilité intra assay sur une population (N=36) de sujets témoins avec des coefficients de variation moyens (écart-types) respectivement à 8.8% (8.7%), 9.5% (8.5%), 6.4% (7.2%), 11.6% (10.6), 11.1% (13.1%) et 7.4% (6.8%) pour l'IFN γ , le TNF α , les IL-10, IL-6, IL-4 et IL-2. Ces résultats ont permis la publication d'une étude montrant l'intérêt du dosage des cytokines dans les EBC d'une population de patients atteints de sclérodémie (60).

Après la réorganisation du service hospitalier, une deuxième phase de mise au point était nécessaire sur le nouveau cytomètre et son kit de dosage. Nous

n'obtenons pas la sensibilité théorique du kit lors des tests sur gamme de calibration. Ce manque de sensibilité entraîne une faible détectabilité des cytokines dans les condensats de sujets témoins. La reproductibilité intra assay évaluée sur les échantillons détectés est également trop importante pour permettre la validation de cette technique.

Nous devons poursuivre l'optimisation de cette technique afin d'augmenter notre sensibilité et permettre le dosage des cytokines dans les EBC. Nous envisageons également l'utilisation de la méthode ELISA qui est la méthode de référence pour le dosage des cytokines. Elle permet le dosage d'une cytokine par échantillon. La recherche de plusieurs cytokines par cette méthode est de ce fait très consommatrice d'EBC. En revanche, elle peut être utilisée lorsque les cytokines d'intérêt sont ciblées. L'analyse des cytokines reste très intéressante pour évaluer de façon spécifique l'inflammation, ce qui nous amène à poursuivre son étude.

II.2.8 Marqueurs d'exposition professionnelle dans les EBC

L'analyse des composés d'exposition professionnelle ou environnementale dans les EBC ne fait pas partie de ce travail de thèse mais intéresse notre équipe. Cette analyse valide le fait que les condensats de l'air exhalé sont bien le reflet de l'arbre bronchique. La voie de pénétration des toxiques environnementaux ou professionnels étant principalement pulmonaire, la mise en évidence directe de ces composés au travers des EBC peut témoigner de l'origine professionnelle de certaines pathologies pulmonaires, et être le reflet de la concentration surfacique de ces composés toxiques au niveau de la muqueuse des voies aériennes. À l'heure actuelle, le dosage de certains métaux lourds est réalisé tels que le chrome, le cobalt, le tungstène mais également, chez des soudeurs, le nickel et le fer (13–16).

Les techniques de dosage sont principalement la spectroscopie d'absorption atomique électrothermique (ETAAS) et la spectrométrie par torche plasma (ICP-MS). Cette dernière technique présente l'avantage d'une analyse rapide et simultanée de nombreux éléments atomiques présents en très faible quantité mais le coût élevé de l'analyse et du matériel rendent son accès difficile favorisant l'utilisation de la première technique.

La mise en évidence de composés minéraux dans les condensats tel que le mica chez un salarié fortement exposé a fait l'objet de travaux lillois récents (17). En ce qui concerne l'exposition à l'amiante, il n'y a pas à ce jour de détection possible des fibres dans le condensat mais l'étude des biomarqueurs du stress oxydant permet une évaluation précoce et infra clinique des pathologies liées (43).

II.2.8.1 Conclusion

Le dosage direct de métaux ou de composés minéraux dans les condensats est possible et est actuellement en cours d'évaluation dans notre laboratoire. La mise en évidence de la charge pulmonaire de ces différents toxiques associés au dosage des biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation peuvent permettre la détection précoce des effets pulmonaires, et contribuer à la compréhension de la physiopathologie pulmonaire en rapport avec ces expositions.

II.2.9 Conclusion sur la standardisation méthodologique du recueil du condensat à l'analyse

La méthode des EBC est aujourd'hui standardisée et validée en ce qui concerne le recueil et l'analyse des biomarqueurs tels que les protéines totales, les NOx, le 8-isoprostane et l'H₂O₂. D'autres biomarqueurs sont encore en cours d'étude tels que le malondialdéhyde et les cytokines. Ce travail méthodologique, publié, nous permet aujourd'hui d'utiliser la méthode des EBC sur des populations homogènes de patients sains et atteints de pathologies inflammatoires pulmonaires chroniques (62).

III. Partie 2 : Étude clinique

III.1 Introduction

L'étude de biomarqueurs de l'inflammation et du stress oxydant pulmonaire dans l'air exhalé (FeNO et EBC) est une approche séduisante du fait de son caractère non invasif. L'étude clinique du FeNO est maintenant bien développée et cet examen peut être réalisé dans le même temps que les explorations fonctionnelles respiratoires. En ce qui concerne la méthode des condensats, les études cliniques sont de plus en plus fréquentes sur des populations présentant des pathologies pulmonaires telles que l'asthme, la BPCO, la fibrose pulmonaire, la mucoviscidose, la sclérodermie mais également chez des patients ventilés ou ayant un reflux gastro œsophagien ou une atteinte rénale. Les données de ces études sont parfois contradictoires selon les biomarqueurs étudiés. Ceci est lié aux caractéristiques des populations et à la méthodologie de recueil et d'analyse des EBC. La publication en 2012 de préconisations méthodologiques (18), alors que les premières recommandations datent de 2005 (3), témoigne de la difficulté d'interprétation des résultats de ces études cliniques. L'objectif actuel est la standardisation de la méthode et la constitution de valeurs de référence chez les témoins et la recherche d'autre biomarqueurs témoignant de l'inflammation et/ou du stress oxydant pulmonaire. L'utilisation des EBC en clinique dépend de cet objectif.

C'est donc après un objectif premier de standardisation que nous étudions le FeNO et les EBC sur des populations de patients adultes atteints de pathologies inflammatoires pulmonaires chroniques telles que l'asthme, la BPCO, la fibrose pulmonaire et la sclérodermie en tenant compte des profils fonctionnels respiratoires.

Le second objectif principal de cette étude est la détection des biomarqueurs d'intérêt dans ces populations avec pour objectif secondaire la comparaison des différents niveaux de biomarqueurs au sein et entre chaque groupe.

Cette étude clinique constitue la deuxième partie de notre recherche. Nous avons choisi d'analyser les protéines totales, les oxydes d'azotes (NOx), le 8-isoprostane ainsi que le FeNO_{0.05}. Le délai entre le recueil des EBC et le dosage des biomarqueurs était incompatible avec le dosage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) du fait de son instabilité. Ce biomarqueur n'est donc pas étudié dans cette étude même si, par ailleurs, nous le dosons sur d'autres populations.

III.2 Matériel et Méthode

III.2.1 Population

Il s'agit d'une étude monocentrique transversale. Les résultats scientifiques que nous présentons portent sur 4 populations de malades bien phénotypés, recrutés au CHRU de Lille avec la collaboration des services d'exploration fonctionnelle respiratoire, de pneumologie, de médecine interne et de médecine du travail du personnel hospitalier. Il s'agit de 24 patients asthmatiques, 20 patients atteints de BPCO, 27 patients atteints de pneumopathie interstitielle diffuse (PID) et 27 patients atteints de sclérodermie (SSc) que nous comparons à 48 témoins (dont 21 fumeurs).

Cette étude a reçu l'approbation du comité de protection des personnes (CPP Nord-Ouest IV). Les sujets témoins et malades ont été inclus dans l'étude après signature d'un consentement éclairé et ont bénéficié des mêmes examens dans l'ordre suivant : évaluation clinique, recueil des condensats, mesure du NO exhalé puis réalisation des tests fonctionnels respiratoires.

III.2.2 Questionnaire

L'évaluation clinique est réalisée à partir d'un questionnaire standardisé du BMRC pour les symptômes respiratoires tels que la toux, l'expectoration, la dyspnée et les sifflements ainsi que pour les habitudes tabagiques (147). Les antécédents personnels et familiaux notamment allergiques sont recueillis ainsi que les traitements. L'atopie est définie par la présence d'un eczéma dans l'enfance persistant, d'une rhinite allergique ou d'un taux d'IgE totales élevé (>91kU/L).

III.2.2.1 Témoins

Les témoins volontaires sont recrutés parmi le personnel du CHRU de Lille en collaboration avec le service de médecine du travail. Pour être inclus, les témoins fumeurs et non fumeurs doivent présenter une fonction ventilatoire normale. Sont exclus : les femmes enceintes, les sujets ayant fumé ou consommé du café ou du thé dans les 4 heures précédant les explorations, les sujets présentant une pathologie évolutive sous jacente susceptible de modifier la fonction respiratoire et de provoquer des anomalies biologiques de la lignée inflammatoire ou une infection récente de moins de 3 mois ainsi que les sujets présentant un facteur de risque environnemental ou professionnel.

III.2.2.2 Malades

L'inclusion des sujets malades réalisée en collaboration avec les services de pneumologie et de médecine interne du CHRU de Lille comporte des critères spécifiques à chaque pathologie. Sont exclus : les femmes enceintes, les sujets ayant fumé ou consommé du café ou du thé dans les 4 heures précédant les explorations, les sujets présentant une autre pathologie évolutive susceptible de

modifier la fonction respiratoire et de provoquer des anomalies biologiques de la lignée inflammatoire ou une infection récente de moins de 3 mois.

III.2.2.2.1 Asthme

Pour les malades asthmatiques, le critère d'inclusion était la présence d'un asthme persistant modéré (GINA3) ou sévère (GINA4) (148). Les traitements par corticostéroïdes inhalés (ICS) et broncho-dilatateurs inhalés (β 2+) sont acceptés contrairement à la prise d'un traitement oral par corticostéroïdes, antileucotriènes ou théophylline qui s'ajoute aux critères généraux d'exclusion.

Nous avons considéré le contrôle de l'asthme au moyen du score de Juniper. Il s'agit d'un questionnaire d'évaluation quantitative de la maîtrise de l'asthme (ACQ) (149–151), dont les six premiers items évaluent sur les 7 derniers jours les symptômes fonctionnels diurnes et nocturnes, la consommation moyenne de broncho-dilatateurs ; le dernier item se rapporte au volume expiré maximal à la 1^{ère} seconde exprimé en pourcentage par rapport à la théorique. Dans notre étude, un score inférieur à 2.2 témoigne d'un contrôle de l'asthme partiel. Le contrôle est considéré comme mauvais au dessus de ce seuil.

III.2.2.2.2 BPCO

Pour les malades atteints de BPCO, nous avons inclu des patients stade 2 et 3 selon la classification GOLD (Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease) (152). Les patients sont caractérisés par l'index BOD. Cet index provient de l'index BODE et prend en compte l'indice de masse corporelle (B), le VEMS (O) et le score de dyspnée selon le MRC (Medical Research Council) (D) (153) mais ne prend pas en compte le test de marche de 6 minutes. L'intérêt de l'index de BOD a été

démontré dans une étude en 2009 par rapport à des hospitalisations pour exacerbation chez les patients atteints de BPCO (154). Nous avons également pris en compte la prise actuelle de corticostéroïdes inhalés (ICS).

La caractérisation s'est également faite sur la présence ou non d'un critère objectif qu'est la distension thoracique à partir du Volume résiduel (VR) de la capacité pulmonaire totale (CPT) et de la capacité résiduelle fonctionnelle (CRF), défini par l'augmentation du VR ou du rapport VR/CPT dans les syndromes mixtes (stade 1), augmentation de la CRF (stade 2) et de la CPT (stade 3).

III.2.2.2.3 Pneumopathies interstitielles

Concernant la population de patients atteints de pneumopathie interstitielle diffuse (PID), l'inclusion repose sur des critères cliniques, fonctionnels, scanographiques et biologiques (composition cellulaire du liquide de lavage broncho alvéolaire).

Les patients ont été caractérisés par la présence sur le scanner d'un syndrome interstitiel avec un aspect de verre dépoli, de rayon de miel ou des bronchectasies de traction.

Les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique ont été spécifiquement étudiés au sein de cette population du fait de la gravité et de la rapidité d'évolution de cette atteinte.

III.2.2.2.4 Sclérodermie (SSc)

Les patients atteints de sclérodermie (SSc) systémique inclus dans notre étude devaient répondre aux critères de l'ACR (155).

Nous avons différencié les patients ayant une atteinte limitée (atteinte cutanée périphérique ne dépassant pas le niveau des genoux ou des coudes) de l'atteinte diffuse (156). La présence ou non d'une complication pulmonaire de type pneumopathie interstitielle avec fibrose est prise en compte de même qu'un traitement par corticothérapie orale.

III.2.3 EFR

Les tests fonctionnels sont effectués selon les recommandations de l'European Respiratory Society en 2005 (157) dans le service des Explorations Fonctionnelles Respiratoires du CHRU de Lille et comportent une spirométrie lente et forcée ainsi qu'un transfert du CO et du NO en apnée. La capacité vitale lente (CVL), le volume expiratoire maximum à la 1^{ère} seconde (VEMS), le rapport VEMS/CVL, le débit expiratoire maximal médian (DEM_{25-75}), la capacité pulmonaire totale (CPT), le volume résiduel (VR), la capacité résiduelle fonctionnelle (CRF), le transfert et le coefficient de transfert du CO en apnée (TLCO et K) ainsi que la capacité de transfert du NO (DLNO) sont retenus dans notre étude.

III.2.4 Mesure de la fraction exhalée du NO (FeNO)

Les concentrations de NO dans l'air exhalé sont mesurées avec un analyseur de NO en chimiluminescence de sensibilité égale à 1ppb (NOx 8000, SERES). Les conditions de réalisation de l'examen sont conformes aux recommandations de l'ATS de 2005 (8). La mesure s'est déroulée sujet debout, sans pince-nez. Après une inspiration profonde d'air filtré du NO (NO free) jusqu'à la capacité pulmonaire totale, la concentration de NO est mesurée, pendant une expiration contrôlée, sur le premier plateau stable de FeNO d'au moins 3 secondes (variations de FeNO <10% ou 1ppb). Deux mesures de FeNO sont effectuées pour chacun des 4 débits expiratoires

imposés : 25, 50 100 et 150ml/s. Sont retenues dans notre étude la FeNO moyenne des 2 mesures à 50 ml/s (FeNO_{0.05}) et la production de NO alvéolaire et bronchique déterminés à partir du modèle de Tsoukias (30) si le R² du modèle est supérieur à 0.64 (62).

La reproductibilité de la méthode a fait l'objet d'une étude dans laquelle deux mesures de NO le matin et deux mesures l'après midi ont été effectuées sur 31 témoins, avec des coefficients de corrélation intra classe ≥ 0.98 (32).

III.2.5 Recueil du condensat

Les condensats sont collectés dans le service des Explorations Fonctionnelles Respiratoires du CHRU de Lille, avant la mesure du FeNO, par un dispositif EcoScreen (Jaeger) décrit précédemment (cf. §II.1.2). Brièvement, le sujet respire normalement par un embout buccal à usage unique au travers d'une valve 2 voies. Un piège à salive évite la contamination salivaire. L'air expiré est isolé et refroidi par un condenseur à -20°C. Un spiromètre électronique branché sur le circuit expiratoire permet la surveillance de la ventilation du sujet. Le recueil est terminé lorsque le volume expiré total atteint 200 litres permettant d'obtenir en moyenne 4mL de condensat.

III.2.6 Analyse des biomarqueurs

III.2.6.1 Dosage des protéines totales (cf. Partie 1§II.2.2.1.3)

L'objectif du dosage des protéines totales dans les EBC est différent selon les auteurs (cf. §II.2.2). Pour certains auteurs, ce dosage reflète l'augmentation des médiateurs de l'inflammation lors d'états pathologiques (72,73,158) ; pour d'autres le niveau des protéines totales serait en rapport avec le degré de dilution des EBC et

servirait de facteur correcteur (12,52). Dans notre étude, la comparaison des niveaux de protéines totales et de NOx entre les groupes est associée à la comparaison des NOx rapportés aux protéines totales.

Les protéines totales dans les EBC sont dosées par méthode μ BCA (MicroBC Assay Protein Quantitation Small kit, Uptima, Interchim). Le dosage est réalisé sur condensat brut, décongelé. La limite de détection est de 1 μ g/ml. Le taux de détectabilité dans notre population est de 96%.

III.2.6.2 Dosage Oxydes d'azote (NOx) (cf. Partie 1§II.2.3.1.2)

Pour le dosage des nitrites totaux, la méthode de Griess modifiée (Griess Reagent Kit, Invitrogen) est utilisée avec détection par spectrophotométrie. La réaction de Griess permet la mesure des nitrites. Les nitrates sont donc préalablement réduits en nitrites pour être quantifiés. La concentration mesurée représente la somme des nitrites et des nitrates présents initialement dans les EBC. L'étape de réduction est réalisée par une technique enzymatique en tubes, utilisant la nitrate réductase (Sigma). La limite de détection est de 2 μ M. Le taux de détectabilité dans notre population est de 100%.

III.2.6.3 Dosage du 8-Isoprostane (cf. Partie 1§II.2.4.1.2)

Pour cette étude, nous utilisons le 8-isoprostane EIA kit (Cayman, Interchim) avec lecture par spectrophotomètre entre 405 et 420 nm (Apollo, LB912, Berthold Technologies). Plus le signal est faible, plus la concentration en 8-isoprostane est élevée. Les données sont analysées à l'aide d'un logiciel (Cayman). La limite de détection est de 2pg/ml. Le taux de détectabilité est de 96%.

III.2.7 Statistiques

L'analyse statistique des données est réalisée grâce au logiciel SAS 9.2 (Cary NC). L'analyse descriptive des biomarqueurs a montré une distribution log normale (test de normalité de Shapiro Wilk). Les résultats sont présentés en valeur moyenne géométrique (écart-type géométrique). Les tests statistiques sont donc effectués sur le logarithme des variables. Lorsque les valeurs des biomarqueurs sont au dessous de la LOD (non détectables), la valeur est fixée à la moitié de la LOD (159).

Les comparaisons de fréquence ont été effectuées par le test du Khi2.

En ce qui concerne les valeurs quantitatives (brutes ou après transformation logarithmique), la comparaison entre les groupes est faite par une analyse de variance (ANOVA) ou, si les effectifs sont faibles, par une analyse non paramétrique de Kruskal Wallis. Pour les biomarqueurs de l'inflammation et du stress oxydant, les moyennes et les écarts types ont été ajustés sur les cofacteurs tabac et atopie.

Les comparaisons deux à deux post hoc sont effectuées dans tous les cas avec la correction de Bonferroni.

Les relations entre les variables quantitatives sont effectuées par un test de corrélation de Spearman comme par exemple, l'association entre les biomarqueurs et les EFR dans les cinq groupes de notre population.

Pour l'ensemble de ces tests, le seuil de significativité est fixé classiquement à 5%, une tendance statistique est évoquée lorsque la probabilité du test est comprise entre 5 et 10%.

III.3 Résultats

III.3.1 Caractéristiques générales

Le **Tableau 9** résume la caractérisation de notre population sur : l'âge, l'indice de masse corporel (BMI), le sexe, l'atopie, le nombre de fumeurs actifs et le tabagisme en paquets année. La population BPCO est essentiellement masculine (90%) contrairement aux populations atteintes de PID et sclérodémie qui sont en majorité composées de femmes. La comparaison deux à deux montre des témoins et des patients asthmatiques significativement plus jeunes par rapport aux patients atteints de BPCO, PID et sclérodémies.

Les témoins ont un BMI significativement plus bas que celui des PID ainsi qu'un tabagisme inférieur à celui des BPCO. Les populations asthmatiques, atteintes de PID et de sclérodémie sont en majorité non fumeuses alors que les BPCO et témoins sont fumeurs actifs pour moitié. Concernant la fréquence de l'atopie, la différence est significative entre les patients BPCO et les témoins d'une part, et d'autre part les patients asthmatiques chez qui elle est plus élevée. On note un nombre important de sujets atopiques parmi les témoins de notre population (45.8%).

Tableau 9 Caractéristiques générales de la population

	Témoins n=48	Asthmes n=24	BPCO n=20	PID n=27	SSc n=27	p
Age ^a (ans)	39.8 (11.5)	44.8 (16.3)	58.4 (9.2) [§] [£]	56.4 (15.2) [§] [£]	55.0 (11.9) [§] [£]	<0.0001
BMI ^a (kg/m ²)	24.2 (4.1)	26.2 (5.1)	27.2 (6.8)	28.4 (5.2) [§]	24.5 (6.5)	0.013
Sexe ^b (Homme)	9 (18.7)	12 (50.0)	18 (90.0)	15 (55.6)	3 (11.1)	<0.0001
Atopie ^b	22 (45.8)	22 (91.7)	6 (30.0) [§] [£]	15 (55.5)	11 (40.7)	<0.001
Tabac ^b (Fumeurs)	21 (43.7)	6 (25.0)	9 (45.0)	1 (3.7)	4 (14.8)	0.001
Tabagisme ^c (PA)	12.8 (9.5)	25.4 (21.1)	40.4 (23.8) [§]	2.0 (-)	12.5 (12.1)	0.002

BPCO: Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive; PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses, SSc: Sclérodémie

p: test Khi2 pour les fréquences ou ANOVA pour les comparaisons de moyenne (p<0.05)

^a résultats présentés en valeurs moyennes (Ecart-types)

^b nombre (pourcentage)

^c en paquets-année

[§] Différence significative avec les témoins (test de Bonferroni p<0.05)

[£] Différence significative avec les asthmatiques (test de Bonferroni p<0.05)

III.3.1.1 Symptomatologie respiratoire

La symptomatologie respiratoire est résumée dans le **Tableau 10**. La toux se manifeste essentiellement chez les sujets BPCO et asthmatiques alors qu'elle concerne peu les sujets atteints de sclérodémie ou les témoins chez qui elle concerne surtout les fumeurs. De même, les expectorations sont présentes sur la moitié des populations BPCO et asthmatiques avec une proportion moindre chez les sujets atteints de PID et de sclérodémie, voire quasi nulle chez les témoins. Les patients asthmatiques, atteints de BPCO ou de PID sont en majorité dyspnéiques. Cette dyspnée concerne la moitié des sclérodémies et on note 16% de sujets présentant une dyspnée stade 1 chez les témoins, expliquée par un BMI plus important. Enfin, 100% des sujets asthmatiques présentent un sifflement.

Tableau 10 Fréquence des symptômes respiratoires de la population

	Témoins n=48	Asthmes n=24	BPCO n=20	PID n=27	SSc n=27	P
Toux ^a						
matin	8 (16.7)	14 (58.3)	13 (65.0)	11 (40.7)	5 (19.2)	<0.0001
journée	5 (10.4)	14 (58.3)	13 (65.0)	13 (48.1)	4 (15.4)	<0.0001
chronique	3 (6.2)	12 (50.0)	13 (65.0)	11 (40.7)	3 (11.5)	<0.0001
Expectorations ^a						
matin	1 (2.1)	13 (54.2)	11 (55.0)	9 (33.3)	4 (15.4)	<0.0001
journée	1 (2.1)	11 (45.8)	12 (60.0)	9 (33.3)	3 (11.5)	<0.0001
chronique	0	9 (37.5)	10 (50.0)	9 (33.3)	3 (11.5)	<0.0001
Dyspnée ^a	8 (16.7)	19 (79.2)	16 (80)	23 (85.2)	14 (53.8)	<0.0001
grade 1	8 (16.7)	8 (33.3)	6 (30.0)	10 (37.0)	7 (26.9)	
grade 2	0	3 (12.5)	4 (20.0)	4 (14.8)	4 (15.4)	
grade 3	0	4 (16.7)	5 (25.0)	6 (22.2)	2 (7.7)	
grade 4	0	4 (16.7)	1 (5.0)	3 (11.1)	1 (3.8)	
Sifflements ^a	6 (12.5)	24 (100)	11 (55.0)	13 (48.1)	3 (11.5)	<0.0001

BPCO: Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive; PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses, SSc: Sclérodémie

p: Khi2

^a nombre (pourcentage)

III.3.1.1.1 EFR

L'étude des explorations fonctionnelles respiratoires est présentée dans le **Tableau 11**. On retrouve des valeurs moyennes normales chez les témoins et les sclérodermies. Les patients asthmatiques et BPCO ont des valeurs moyennes significativement diminuées sur le rapport VEMS/CVL et sur le DEM₂₅₋₇₅ témoignant de l'obstruction des voies aériennes. Concernant les patients atteints de PID, Les valeurs moyennes basses de la CPT montrent une prédominance restrictive. Le rapport VR/CPT élevé, témoignant de la distension, est relevé chez les asthmatiques et le groupe BPCO par rapport aux témoins. L'étude du transfert du CO (TLCO) retrouve des valeurs plus basses que les témoins dans le groupe PID mais également dans les groupes BPCO et sclérodermie. Enfin, l'étude de la capacité de transfert du NO (DLNO) est diminuée dans le groupe PID en comparaison des témoins.

Tableau 11 Résultats des EFR de la population

	Témoins n=48	Asthmes n=24	BPCO n=20	PID n=27	SSc n=27	p
CVL ^a	1.10 (0.11)	0.88 (0.21) [§]	0.91 (0.20) [§]	0.83 (0.19) [§]	0.96 (0.20) [§]	<0.0001
VEMS ^a	1.05 (0.11)	0.59 (0.22)[§]	0.57 (0.19)[§]	0.82 (0.20) [§]	0.93 (0.22) [§]	<0.0001
VEMS/CVL ^a	0.99 (0.07)	0.73 (0.13)[§]	0.66 (0.17)[§]	1.03 (0.11)	1.03 (0.10)	<0.0001
DEM ₂₅₋₇₅ ^a	0.87 (0.19)	0.27 (0.15)[§]	0.22 (0.11)[§]	0.76 (0.35)	0.80 (0.35)	<0.0001
VR ^a	1.04 (0.18)	1.50 (0.48) [§]	1.65 (0.47) [§]	0.72 (0.22) [§]	0.99 (0.29) [§]	<0.0001
CRF ^a	1.01 (0.18)	1.15 (0.30)	1.41 (0.37) [§]	0.69 (0.17) [§]	0.92 (0.18)	<0.0001
CPT ^a	1.07 (0.09)	1.07 (0.15)	1.15 (0.18)	0.77 (0.17)[§]	0.95 (0.15) [§]	<0.0001
VR/CPT ^b	0.30 (0.05)	0.45 (0.14)[§]	0.50 (0.11)[§]	0.33 (0.07)	0.38 (0.08)	<0.0001
TLCO ^a	0.86 (0.12)	0.82 (0.19)	0.60 (0.21)[§]	0.55 (0.16)[§]	0.66 (0.17)[§]	<0.0001
K ^b	4.60 (0.81)	4.69 (0.91)	3.40 (1.18)	3.87 (1.09)	3.89 (0.80)	<0.0001
DLNO ^b	116.20 (27.56)	122.52 (44.91)	79.39 (25.31) [§]	70.81 (25.44)[§]	89.53 (21.45) [§]	<0.0001

BPCO: Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive; PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses, SSc: Sclérodermie

CVL: capacité vitale lente; VEMS, volume expiratoire maximum en 1s; CPT: capacité pulmonaire totale; DEM₂₅₋₇₅: débit expiratoire maximal médian; VR: volume résiduel; CRF: capacité résiduelle fonctionnelle; TLCO: transfert du CO en apnée; K: Coefficient de transfert du CO; DLNO: capacité de transfert du monoxyde d'azote

p: ANOVA p<0.05

^a Résultats présentés sous forme de rapport valeurs observées / valeurs prédites, moyenne (écart-type)

^b moyenne (écart-type)

[§] Différence significative avec les témoins (test de Bonferroni p<0.05)

III.3.1.1.2 Recueil des condensats de l'air exhalé

Le recueil des condensats de l'air exhalé (EBC) s'est effectué jusque 200 litres de volume expiré cumulé ce qui a permis un recueil moyen (écart-type) de 4.5ml (1.2). Le temps moyen (écart-type) est de 24min (7.5). Pour tous ces paramètres, nous n'avons pas noté de différence significative entre les groupes.

III.3.2 Niveaux des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé

III.3.2.1 Etude des biomarqueurs de l'air exhalé sur les 5 groupes de sujets

Les résultats des marqueurs de l'inflammation dans l'air exhalé sont rapportés dans le **Tableau 12**. Ils objectivent une différence significative pour le FeNO_{0.05} et le NO_{bronchique}, plus élevés chez les asthmatiques ainsi que du FeNO_{alvéolaire} augmenté dans le groupe PID et le groupe sclérodémie par rapport aux témoins.

Les analyses de variance montrent une relation significative entre les pathologies et le niveau des NOx dans les EBC. On retrouve notamment une augmentation significative des NOx chez les patients atteints de sclérodémie et une tendance à l'augmentation des NOx chez les BPCO.

Tableau 12 Résultats des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé sans prise en compte des cofacteurs

	Témoins n=48	Asthmes n=24	BPCO n=20	PID n=27	SSc n=27	p
FeNO _{0.05} (ppb) ^a	10.5 (2.06)	22.2 (2.38) [§]	9.1 (2.34)	17.1 (1.73)	12.5 (2.01)	0.001
NO _{bronchique} (nL/min) ^a	28.5 (2.11)	71.6 (2.20) [§]	45.2 (2.84)	36.5 (2.02)	24.7 (3.15)	0.009
FeNO _{alvéolaire} (ppb) ^a	2.5 (1.84)	3.6 (1.64)	2.7 (2.54)	5.7 (1.83) [§]	5.0 (1.37) [§]	<0.001
Protéines (µg/mL) ^a	3.6 (2.35)	5.4 (2.23)	6.2 (2.52)	5.1 (1.50)	4.3 (2.18)	0.064
8-Isoprostane (pg/mL) ^a	18.5 (1.76)	20.3 (2.13)	16.4 (2.05)	11.7 (2.26)	12.9 (4.68)	0.165
NOx (µM) ^a	10.2 (1.74)	13.9 (1.78)	16.6 (2.03)	10.4 (2.04)	17.8 (2.26) [§]	0.002
NOx/Protéines ^a	2.8 (2.43)	2.5 (2.62)	2.7 (2.85)	2.0 (1.92)	4.0 (1.77)	0.095

BPCO: Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive; PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses, SSc: Sclérodémie

FeNO_{0.05}: Fraction exhalée du NO à 50 ml/s, NOx: Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

p: ANOVA (p<0.05)

^a Résultats présentés en valeurs moyenne géométrique (écart-type géométrique)

[§] Différence significative avec les témoins (test de Bonferroni p<0.05)

III.3.2.2 Étude des biomarqueurs de l'air exhalé chez les témoins*

Afin de s'affranchir de l'effet pathologie, nous étudions l'influence des cofacteurs sur les niveaux des biomarqueurs dans la population des témoins.

III.3.2.2.1 Étude des cofacteurs pouvant influencer les niveaux de biomarqueurs

Nous n'avons pas trouvé de relations entre le niveau des biomarqueurs et le sexe ou le BMI. L'étude des corrélations entre les biomarqueurs et les EFR montre une corrélation négative entre le FeNO_{alvéolaire} et le rapport VEMS/CVL, indiquant une augmentation de ce paramètre en rapport avec l'obstruction ($r=-0.44$; $p(r)=0.016$). (160).

III.3.2.2.1.1 Âge

Dans notre population témoin ($n=48$), relativement jeune, l'étude des corrélations ne retrouve pas d'effet âge sur l'ensemble des biomarqueurs en accord avec l'étude de Cruz *et al* en 2008 pour les NOx (nitrites et les nitrates) dans les EBC (110). Les auteurs retrouvaient un effet âge sur les 8-isoprostanes dans les EBC entre les sujets les plus âgés (60-80ans) et les plus jeunes (18-29 ans et 30-39 ans).

III.3.2.2.1.2 Tabac

Concernant l'effet du tabac, on retrouve une tendance sur le FeNO ($p=0.078$) avec des valeurs plus basses chez les fumeurs. Il existe une corrélation négative modérée entre la consommation cumulée de tabac et les NOx.

Les données de la littérature sont contradictoires en ce qui concerne les effets du tabac sur les biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé. Certains retrouvent une

augmentation de FeNO (161), des NOx (72) ou du 8-isoprostane (116) chez les fumeurs. D'autres ne retrouvent aucune différence sur les protéines totales (138,161), sur les NOx (162), le FeNO (163) ou sur le 8-isoprostane (111,163,164).

La diminution du FeNO chez les témoins fumeurs dans notre étude, également démontrée par de nombreux auteurs (116,165,166), peut s'expliquer par une diminution de l'activité des iNOs chez les fumeurs du fait de l'installation d'une inflammation chronique avec mise en œuvre d'un rétrocontrôle par les médiateurs anti-inflammatoires, notamment certaines cytokines (cf. §I.2.2 p6) (4).

III.3.2.2.1.3 Atopie

L'étude de l'effet de l'atopie sur les biomarqueurs de l'air exhalé retrouve un effet significatif pour le 8-isoprostane ($p=0.032$) avec des valeurs plus faibles chez les témoins atopiques. Ces résultats sont concordants avec ceux de Mondino *et al* en 2004 qui n'avaient pas non plus retrouvé d'augmentation du 8-isoprostane chez les enfants atopiques non asthmatiques par rapport aux témoins (102).

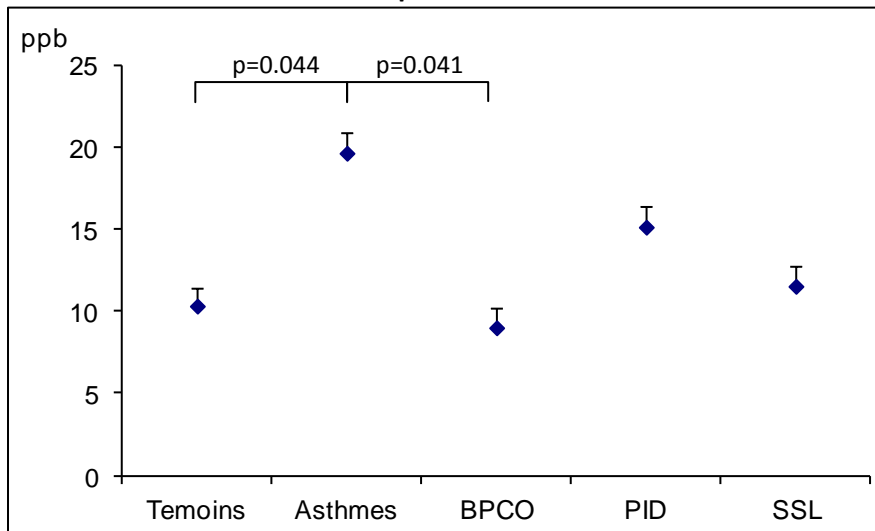
L'analyse de l'effet synergique de l'atopie et du tabac sur les isoprostanes montre une tendance à la baisse ($p=0.076$) avec un effet atopie significatif. Concernant le FeNO_{0,05}, seul le tabac est significatif sur la diminution de concentration du NO.

Au total, ce chapitre montre l'intérêt de prendre en compte les facteurs tabac et atopie pour comparer les niveaux de biomarqueurs entre les groupes de sujets sains et malades.

III.3.2.3 Étude des biomarqueurs de l'air exhalé sur les 5 groupes avec prise en compte des cofacteurs

Les **Figures 9 à 14** montrent les niveaux de biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé des 5 groupes avec prise en compte des cofacteurs tabac et atopie.

Figure 9. FeNO_{0.05} mesuré dans l'air exhalé avec prise en compte des cofacteurs tabac et atopie

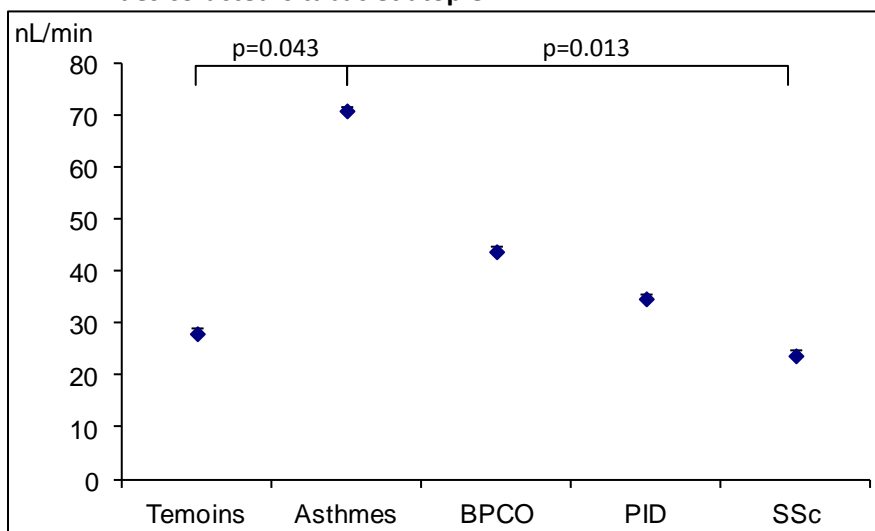


BPCO: Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive; PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses
SSc: Sclérodermie

p: test de Bonferroni $p < 0.05$

† Erreur standard de la valeur moyenne géométrique (◆)

Figure 10. FeNO_{bronchique} mesuré dans l'air exhalé avec prise en compte des cofacteurs tabac et atopie

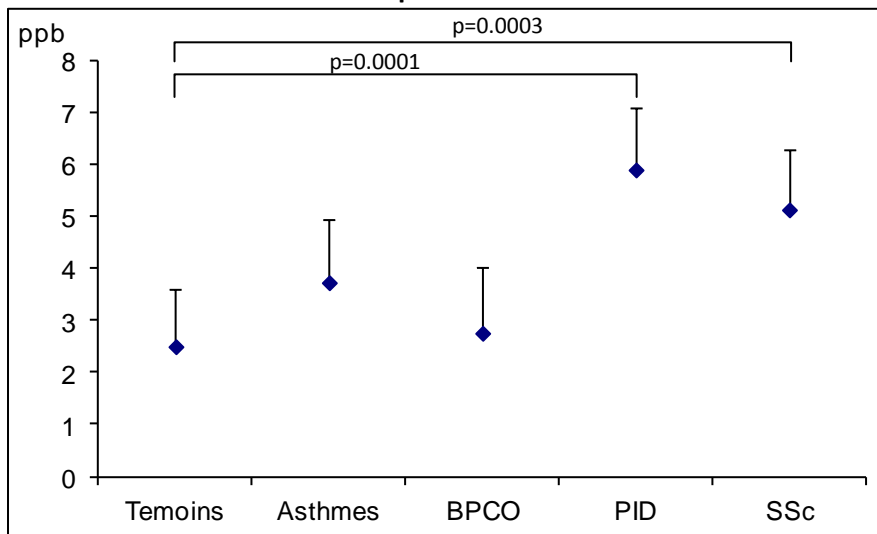


BPCO: Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive; PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses
SSc: Sclérodermie

p: test de Bonferroni $p < 0.05$

† Erreur standard de la valeur moyenne géométrique (◆)

Figure 11. FeNO_{alvéolaire} mesuré dans l'air exhalé avec prise en compte des cofacteurs tabac et atopie



BPCO: Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive; PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses

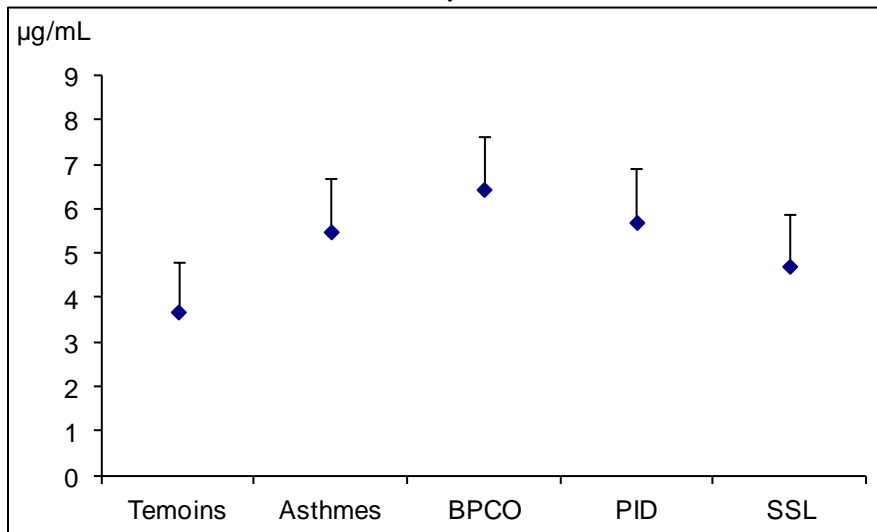
SSc: Sclérodémie

p: test de Bonferroni $p < 0.05$

T Erreur standard de la valeur moyenne géométrique (◆)

Les niveaux de FeNO_{0.05} restent plus élevés chez les asthmatiques par rapport aux groupes témoins et BPCO. Les niveaux de NO_{bronchique} restent plus élevés chez les asthmatiques par rapport aux groupes témoins et sclérodémie. Enfin, le FeNO_{alvéolaire} est toujours augmenté dans les groupes PID et sclérodémie par rapport aux témoins. Concernant ces 3 paramètres, la prise en compte du tabac et de l'atopie ne modifie pas les résultats puisque ces différences étaient déjà mises en évidence (cf. Tableau 12).

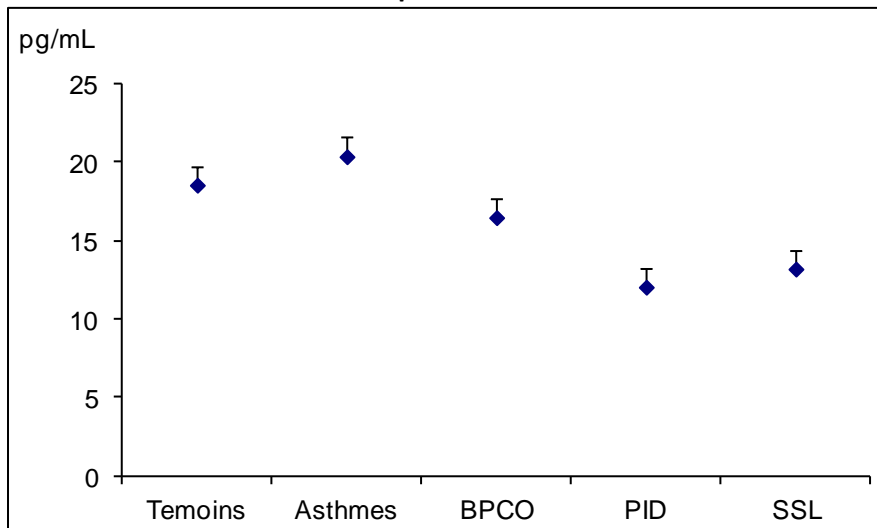
Figure 12. Protéines totales mesurées dans l'EBC avec prise en compte des cofacteurs tabac et atopie



BPCO: Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive ; PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses
SSL: Sclérodémie

† Erreur standard de la valeur moyenne géométrique (◆)

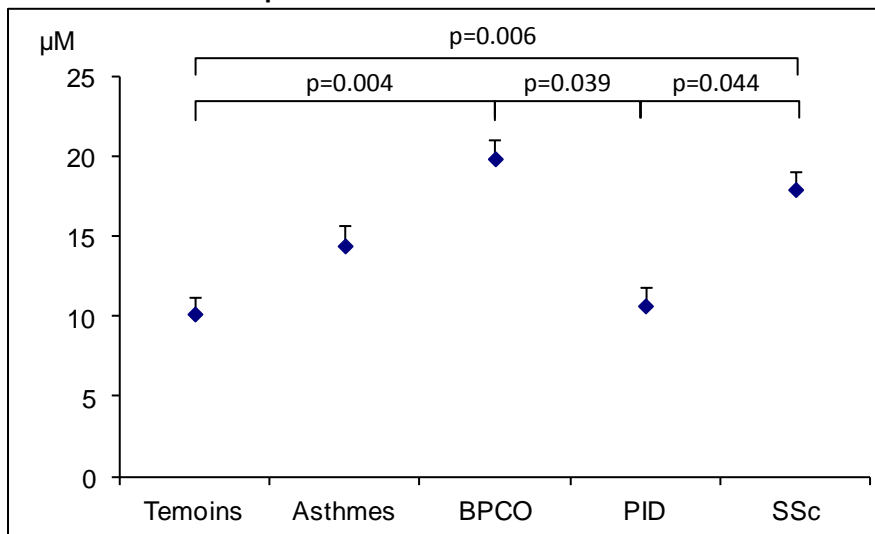
Figure 13. 8-Isoprostane mesuré dans l'EBC avec prise en compte des cofacteurs tabac et atopie



BPCO: Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive; PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses
SSL: Sclérodémie

† Erreur standard de la valeur moyenne géométrique (◆)

Figure 14. NOx mesurés dans l'EBC avec prise en compte des cofacteurs tabac et atopie



BPCO: Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive; PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses
SSc: Sclérodémie

p: test de Bonferroni $p < 0.05$

^T Erreur standard de la valeur moyenne géométrique (◆)

Dans les EBC, concernant les protéines totales, la prise en compte des cofacteurs a mis en évidence un effet groupe de sujets avec un $p=0.048$ limite de la significativité mais les comparaisons deux à deux ne sont pas significatives.

Concernant le 8-isoprostane, la tendance est la même que celle de l'étude sans les cofacteurs avec une absence de différence significative entre les groupes, expliquée par des niveaux élevés chez les témoins.

Concernant l'étude des NOx, le groupe sclérodémie a des niveaux significativement plus élevés que les témoins et le groupe PID. Pour le groupe BPCO, cette analyse met en évidence des niveaux significativement plus élevés de NOx par rapport aux témoins et au groupe PID.

III.3.2.4 Niveaux des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé au sein de chaque pathologie

Après cette analyse globale, nous analysons les caractéristiques spécifiques de chaque pathologie (**Tableau 13**). Dans ces analyses particulières, le groupe témoin est repris systématiquement. Un tableau de synthèse (p100) résume l'ensemble des résultats significatifs.

III.3.2.4.1 Asthme

Nous avons étudié l'importance des profils cliniques des asthmatiques sur les marqueurs de l'inflammation, tels que le contrôle et la sévérité de la maladie par rapport aux témoins. La quasi-totalité (96%) des patients étant sous traitement par corticoïdes inhalés, nous n'avons pas étudié ce facteur.

Tableau 13. Caractéristiques générales de la sous population asthmatique

	Asthmes n=24	Contrôle ^d		p	Sévérité ^e		p
		Partiel n=10	Mauvais n=14		GINA III n=11	GINA IV n=13	
Age ^b (ans)	44.8 (16.3)	46.0 (15.5)	44.6 (18.0)	0.642	45.8 (19.9)	44.0 (13.4)	0.685
BMI (kg/m ²) ^b	26.2 (5.1)	26.61 (5.28)	25.72 (5.28)	0.733	27.57 (5.53)	25.04 (4.57)	0.297
Tabagisme ^c (PA)	25.4 (21.1)	28.7 (27.6)	20.5 (13.4)	1.000	12.7 (8.6)	44.5 (20.5)	0.149
CVL ^a	0.88 (0.21)	0.97 (0.23)	0.81 (0.18)	0.193	1.00 (0.18)	0.77 (0.18)	0.010
VEMS ^a	0.59 (0.22)	0.67 (0.26)	0.55 (0.18)	0.306	0.78 (0.16)	0.43 (0.13)	<0.0001
VEMS/CVL ^a	0.73 (0.13)	0.74 (0.14)	0.76 (0.10)	0.78	0.82 (0.04)	0.67 (0.15)	0.003
DEM ₂₅₋₇₅ ^a	0.27 (0.15)	0.32 (0.18)	0.24 (0.12)	0.339	0.40 (0.12)	0.16 (0.05)	<0.0001
VR ^a	1.50 (0.48)	1.45 (0.54)	1.55 (0.47)	0.642	1.27 (0.29)	1.70 (0.53)	0.037
CRF ^a	1.15 (0.30)	1.16 (0.30)	1.14 (0.32)	0.975	1.05 (0.18)	1.24 (0.35)	0.099
CPT ^a	1.07 (0.15)	1.09 (0.16)	1.05 (0.14)	0.515	1.07 (0.13)	1.07 (0.17)	0.643
VR/CPT ^b	0.45 (0.14)	0.40 (0.12)	0.48 (0.15)	0.306	0.38 (0.11)	0.51 (0.14)	0.024
TlCO ^a	0.82(0.19)	0.93 (18.62)	0.75 (0.16)	0.070	0.92 (0.18)	0.72 (0.16)	0.028
K ^b	4.69 (0.91)	4.76 (0.78)	4.64 (1.02)	0.847	4.79 (0.56)	4.58 (1.19)	0.427
DLNO ^b	122.52 (44.91)	148.81 (53.07)	105.00 (30.09)	0.087	144.61 (35.11)	103.20 (45.41)	0.056

CVL: capacité vitale lente; VEMS, volume expiratoire maximum en 1s; CPT: capacité pulmonaire totale; DEM₂₅₋₇₅: débit expiratoire maximal médian; VR: volume résiduel; CRF: capacité résiduelle fonctionnelle; TlCO: transfert du CO en apnée; K: Coefficient de transfert du CO; DLNO: capacité de transfert du monoxyde d'azote

p: tests non paramétriques (p<0.05)

^a Résultats présentés sous forme de rapport valeurs observées/valeurs prédites, moyenne (écart-type)

^b moyenne (écart-type)

^c en paquets-année

^d Mauvais contrôle: Score de Juniper>2.2

^e Selon la classification GINA 2007; GINA III : persistant modéré ; GINA IV: persistant sévère

III.3.2.4.1.1 *Corrélation entre Biomarqueurs et EFR chez les asthmatiques*

L'étude des corrélations entre biomarqueurs de l'air exhalé et les EFR retrouve une corrélation modérée du FeNO_{0.05} avec la diminution du DEM₂₅₋₇₅ (r= -0.40 ; p=0.002) ainsi que du NO_{bronchique} avec la diminution du rapport VEMS/CVL (r=-0.43 ; p=0.003) et du DEM₂₅₋₇₅ (r=0.45 ; p=0.003). Ainsi, plus la fonction respiratoire est altérée, plus la valeur du NO est élevée.

Concernant les autres biomarqueurs, aucune corrélation robuste n'est retrouvée. En 2006, Baraldi *et al* n'avaient retrouvé aucune corrélation entre le FeNO et les paramètres de la fonction pulmonaire (167).

Ces résultats sont cependant cohérents puisque les EFR traditionnelles sont l'expression indirecte et plus tardive des atteintes respiratoires présentes ou passées contrairement aux paramètres inflammatoires mesurés (60).

III.3.2.4.1.2 Étude du contrôle de l'asthme - Juniper

Tableau 14. Résultats des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé chez les témoins et asthmatiques en fonction du contrôle de l'asthme (Juniper)

	Témoins n=48	Asthmes ^b Cntrôle P n=10	Asthmes ^b Mauvais Cntrôle n=14	p
FeNO _{0.05} (ppb) ^a	10.5 (2.06)	25.2 (1.68)	21.5 (3.02)	0.005
NO _{bronchique} (nL/min) ^a	28.5 (2.11)	74.8 (1.82)	68.5 (2.69)	0.006
FeNO _{alvéolaire} (ppb) ^a	2.5 (1.84)	3.7 (1.72)	3.5 (1.62)	0.224
Protéines (µg/mL) ^a	3.6 (2.35)	3.7 (2.20)	7.2 (2.09)	0.029
8-Isoprostane (pg/mL) ^a	18.5 (1.76)	17.0 (2.03)	25.2 (2.30)	0.644
NOx (µM) ^a	10.2 (1.74)	16.1 (1.61)	11.9 (1.94)	0.074
NOx/Protéines ^a	2.8 (2.43)	4.4 (2.27)	1.6 (2.42)	0.044

FeNO_{0.05}: Fraction exhalée du NO à 50 ml/s; NOx: Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

p: Kruskal Wallis (p<0.05)

^a résultats présentés en valeur moyenne géométrique (écart-type géométrique)

^b Mauvais contrôle: Score de Juniper>2.2

Le contrôle de l'asthme a été étudié par le score de Juniper (151), en considérant le score de 2.2 au delà duquel le contrôle de l'asthme est mauvais (MC). En deçà de ce score, le contrôle est considéré comme partiel (CP). Le **Tableau 14** présenté ci-dessus résume les niveaux de biomarqueurs dans l'air exhalé en fonction du contrôle de l'asthme par rapport aux témoins.

Concernant le FeNO_{0.05} et le NO_{bronchique}, les niveaux sont inférieurs chez les témoins. Ces deux marqueurs ne sont pas significativement différents entre les deux groupes d'asthme. Dans les EBC, concernant les protéines, il existe une différence significative avec une tendance (p=0.067) entre les deux groupes d'asthme. Il existe une tendance concernant les NOx avec des valeurs plus élevées chez les asthmes (PC) sans différence retrouvée avec les asthmes (MC). Cette différence entre les deux groupes asthmatiques devient significative lorsqu'on rapporte les NOx aux protéines (p=0.038) pour tenir compte de la dilution. Là encore, ce rapport est plus élevé chez les asthmes (PC).

III.3.2.4.1.3 Étude de la sévérité de l'asthme - GINA

Tableau 15. Résultats des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé chez les témoins et asthmatiques en fonction de la gravité de l'asthme (GINA 2007)

	Témoins n=48	Asthmes ^e GINA III n=11	Asthmes ^e GINA IV n=13	p ^c
FeNO _{0.05} (ppb) ^a	10.51 (2.06)	25.15 (1.76)	19.77 (2.97)	0.005
NO _{bronchique} (nL/min) ^a	28.48 (2.11)	81.63 (1.76)	60.11 (2.86)	0.004
FeNO _{alvéolaire} (ppb) ^a	2.47 (1.84)	4.44 (1.56)	2.75 (1.57)	0.044
Protéines (µg/mL) ^a	3.61 (2.35)	4.68 (2.21)	6.20 (2.28)	0.059
8-Isoprostane (pg/mL) ^a	18.49 (1.76)	18.12 (2.50)	22.64 (1.78)	0.427
NOx (µM) ^a	10.23 (1.74)	16.16 (1.80)	12.30 (1.75)	0.058
NOx/Protéines ^a	2.83 (2.43)	3.73 (2.38)	1.84 (2.60)	0.192

FeNO_{0.05}: Fraction exhalée du NO à 50 ml/s; NOx: Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

p: Kruskal Wallis (p<0.05)

^a résultats présentés en valeur moyenne géométrique (écart-type géométrique)

^e Selon la classification GINA 2007; GINA III : persistant modéré ; GINA IV: persistant sévère

La table présentée ci-dessus (**Tableau 15**) résume les niveaux de biomarqueurs dans l'air exhalé en fonction de la gravité de l'asthme selon la classification GINA par rapport aux témoins (148). L'étude du NO exhalé retrouve une différence significative pour le FeNO_{0.05}, le NO_{bronchique} et le FeNO_{alvéolaire} avec des valeurs plus hautes chez les asthmes GINA III. Seul le FeNO_{alvéolaire} est augmenté chez les asthmes GINA III par rapport aux asthmes GINA IV. Concernant les EBC, il existe une tendance pour les protéines et les NOx avec des valeurs plus élevées chez les GINA IV pour les protéines et GINA III pour les NOx sans différence retrouvée entre les GINA III et IV pour les deux biomarqueurs.

III.3.2.4.2 BPCO

Nous avons caractérisé les patients atteints de BPCO en fonction de la sévérité d'une part, selon la classification GOLD (152) et d'autre part, à partir du score prédictif d'hospitalisation pour exacerbation BOD intégrant l'indice de masse corporelle, le score de dyspnée et le VEMS (154). Dans ce dernier cas, un score égal à 2 constitue la limite dans notre population. Nous avons également étudié l'effet de la présence d'une distension pulmonaire grâce au VR, à la CPT et au rapport VR/CPT (168) et l'impact d'une corticothérapie inhalée sur le niveau des biomarqueurs. Les **Tableaux 16 et 17** donnent les caractéristiques générales de cette sous-population selon ces différents critères.

Tableau 16. Caractéristiques générales de la sous population BPCO en fonction de la sévérité selon le GOLD ou le score BOD

	BPCO n=20	Sévérité ^d			BOD ^e		
		GOLD II n=12	GOLD III n=8	p	<2 n=12	>2 n=8	p
Age ^b (ans)	58.4 (9.2)	56.2 (9.7)	61.7 (7.6)	0.114	56.0 (9.7)	62.0 (7.4)	0.083
BMI ^b (kg/m ²)	27.2 (6.8)	29.34 (7.33)	23.98 (4.47)	0.083	29.46 (7.35)	23.80 (4.15)	0.045
Tabagisme ^c (PA)	40.4 (23.8)	44.5 (19.4)	35.3 (30.8)	0.623	44.5 (19.4)	35.3 (30.8)	0.623
CVL ^a	0.91 (0.20)	0.96 (0.14)	0.84 (0.25)	0.375	0.92 (0.13)	0.90 (0.28)	0.847
VEMS ^a	0.57 (0.19)	0.69 (0.13)	0.40 (0.08)	<0.001	0.67 (0.15)	0.43 (0.12)	0.003
VEMS/CVL ^a	0.66 (0.17)	0.75 (0.11)	0.54 (0.16)	0.010	0.75 (0.11)	0.54 (0.16)	0.008
DEM ₂₅₋₇₅ ^a	0.22 (0.11)	0.27 (0.09)	0.13 (0.07)	0.001	0.27 (0.10)	0.13 (0.07)	0.004
VR ^a	1.65 (0.47)	1.43 (0.36)	1.97 (0.45)	0.005	1.48 (0.39)	1.90 (0.49)	0.034
CRF ^a	1.41 (0.37)	1.24 (0.26)	1.66 (0.37)	0.023	1.25 (0.27)	1.65 (0.38)	0.028
CPT ^a	1.15 (0.18)	1.10 (0.14)	1.22 (0.22)	0.263	1.10 (0.14)	1.23 (0.22)	0.153
VR/CPT ^b	0.50 (0.11)	0.44 (0.08)	0.58 (0.08)	0.004	0.46 (0.09)	0.56 (0.11)	0.041
TLCO ^a	0.60 (0.21)	0.72 (0.20)	0.44 (0.11)	0.002	0.71 (0.20)	0.45 (0.11)	0.004
K ^b	3.40 (1.18)	3.91 (1.08)	2.69 (0.96)	0.035	3.93 (1.06)	2.67 (0.97)	0.029
DLNO ^b	79.39 (25.31)	92.00 (14.51)	57.33 (26.36)	0.073	93.92 (14.89)	61.96 (25.07)	0.055

BPCO: Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive

CVL: capacité vitale lente; VEMS, volume expiratoire maximum en 1s; CPT: capacité pulmonaire totale; DEM₂₅₋₇₅: débit expiratoire maximal médian; VR: volume résiduel; CRF: capacité résiduelle fonctionnelle; TLCO: transfert du CO en apnée; K: Coefficient de transfert du CO; DLNO: capacité de transfert du monoxyde d'azote

p: tests non paramétriques (p<0.05)

^a Résultats présentés sous forme de rapport valeurs observées/valeurs prédites, moyenne (écart-type)

^b moyenne (écart-type)

^c en paquets-année

^d Selon classification GOLD

^e BOD: index composite intégrant l'index de masse corporelle, le VEMS, le score de dyspnée

Tableau 17. Caractéristiques générales de la sous population BPCO en fonction de la distension pulmonaire ou de la mise en place d'une corticothérapie inhalée

	BPCO n=20	Distension			Corticothérapie inhalée		
		Non n=7	Oui n=13	p	Non n=11	Oui n=9	p
Age ^b (ans)	58.4 (9.2)	56.1 (11.7)	59.7 (7.7)	0.205	55.3 (7.4)	62.2 (10.1)	0.095
BMI ^b (kg/m ²)	27.2 (6.8)	30.34 (8.27)	25.50 (5.42)	0.132	28.67 (7.86)	25.39 (4.96)	0.494
Tabagisme ^c (PA)	40.4 (23.8)	39.4 (15.1)	40.7 (26.8)	1.000	31.7 (16.5)	51.3 (29.5)	0.389
CVL ^a	0.91 (0.20)	0.87 (0.19)	0.94 (0.20)	0.303	0.81 (0.18)	1.04 (0.12)	0.006
VEMS ^a	0.57 (0.19)	0.65 (0.18)	0.53 (0.18)	0.113	0.57 (0.19)	0.58 (0.19)	1.000
VEMS/CVL ^a	0.66 (0.17)	0.77 (0.09)	0.60 (0.17)	0.048	0.71 (0.13)	0.60 (0.20)	0.196
DEM ₂₅₋₇₅ ^a	0.22 (0.11)	0.26 (0.09)	0.19 (0.11)	0.142	0.22 (0.10)	0.21 (0.13)	0.879
VR ^a	1.65 (0.47)	1.24 (0.15)	1.86 (0.44)	0.001	1.62 (0.49)	1.68 (0.48)	0.761
CRF ^a	1.41 (0.37)	1.05 (0.13)	1.61 (0.29)	<0.001	1.30 (0.30)	1.55 (0.41)	0.171
CPT ^a	1.15 (0.18)	0.99 (0.09)	1.24 (0.16)	0.003	1.07 (0.15)	1.25 (0.18)	0.040
VR/CPT ^b	0.50 (0.11)	0.44 (0.12)	0.53 (0.09)	0.081	0.51 (0.12)	0.48 (0.10)	0.761
TLCO ^a	59.95 (21.40)	65.33 (19.58)	57.46 (22.49)	0.380	60.82 (15.89)	58.75 (28.53)	0.710
K ^b	3.40 (1.18)	3.70 (0.91)	3.26 (1.30)	0.405	3.40 (0.86)	3.39 (1.59)	0.967
DLNO ^b	79.39 (25.31)	87.20 (36.87)	74.93 (18.01)	0.219	83.81 (27.51)	67.63 (16.45)	0.185

BPCO: Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive; CVL: capacité vitale lente; VEMS, volume expiratoire maximum en 1s; CPT: capacité pulmonaire totale; DEM₂₅₋₇₅: débit expiratoire maximal médian; VR: volume résiduel; CRF: capacité résiduelle fonctionnelle; TLCO: transfert du CO en apnée; K: Coefficient de transfert du CO; DLNO: capacité de transfert du monoxyde d'azote

p: tests non paramétriques (p<0.05)

^a Résultats présentés sous forme de rapport valeurs observées/valeurs prédites, moyenne (écart-type)

^b moyenne (écart-type)

^c en paquets-année

III.3.2.4.2.1 Corrélation entre Biomarqueurs et EFR chez les patients BPCO

L'étude des corrélations des biomarqueurs de l'air exhalé chez les patients BPCO avec les EFR retrouve une corrélation positive faible mais significative entre le niveau des NOx et le VR ($r=0.24$; $p(r)=0.047$) ou la CPT ($r=0.26$; $p(r)=0.034$) indiquant une augmentation des NOx avec le degré de distension. Une corrélation très fortement positive avec le DEM₂₅₋₇₅ est retrouvée avec le FeNO_{alvéolaire} ($r=0.94$; $p(r)=0.016$) ainsi qu'une tendance fortement corrélée avec le NO_{bronchique} ($r=0.86$; $p(r)=0.063$). Cette analyse rejoint les résultats de Corradi *et al.* qui retrouvent une corrélation positive ($r=0.65$, $p(r)=0.001$) entre le VEMS et le NO exhalé suggérant que cette baisse du NO exhalé et donc de son effet bronchodilatateur contribue à l'obstruction bronchique chez les patients BPCO (165).

III.3.2.4.2.2 Étude chez les BPCO de la gravité selon les critères GOLD

Tableau 18. Résultats des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé chez les témoins et BPCO en fonction de la gravité (GOLD)

	Témoins n=48	BPCO GOLD II n=12	BPCO GOLD III n=8	p
FeNO _{0.05} (ppb) ^a	10.51 (2.06)	8.34 (1.78)	10.45 (3.34)	0.796
NO _{bronchique} (nL/min) ^a	28.48 (2.11)	NA	40.69 (3.24)	
FeNO _{alvéolaire} (ppb) ^a	2.47 (1.84)	NA	2.88 (2.91)	
Protéines (µg/mL) ^a	3.61 (2.35)	5.87 (2.37)	6.77 (2.91)	0.084
8-Isoprostane (pg/mL) ^a	18.49 (1.76)	14.50 (2.21)	18.84 (1.91)	0.504
NOx (µM) ^a	10.23 (1.74)	16.40 (2.15)	16.93 (1.95)	0.072
NOx/Protéines ^a	2.83 (2.43)	2.80 (3.02)	2.50 (2.79)	0.785

FeNO_{0.05}: Fraction exhalée du NO à 50 ml/s; NOx: Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

NR : modèle non applicable

p: Kruskal Wallis (p<0.05)

^a résultats présentés en valeur moyenne géométrique (écart-type géométrique)

Le tableau présenté ci-dessus (**Tableau 18**) résume les niveaux de biomarqueurs dans l'air exhalé en fonction de la gravité de la BPCO selon la classification GOLD par rapport aux témoins. On note uniquement une tendance à l'augmentation des NOx chez les patients BPCO GOLD II et III par rapport aux témoins. L'étude du NO exhalé est sans particularité.

Tableau 19. Résultats des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé chez les témoins et BPCO en fonction d'un index prédictif d'hospitalisation (BOD)

	Témoins n=48	BPCO ^b BOD<2 n=12	BPCO ^b BOD>2 n=8	p
FeNO _{0.05} (ppb) ^a	10.51 (2.06)	7.87 (1.65)	11.47 (3.43)	0.605
NO _{bronchique} (nL/min) ^a	28.48 (2.11)	NA	47.54 (3.32)	
FeNO _{alvéolaire} (ppb) ^a	2.47 (1.84)	NA	2.97 (2.88)	
Protéines (µg/mL) ^a	3.61 (2.35)	5.68 (2.37)	7.10 (2.89)	0.083
8-Isoprostane (pg/mL) ^a	18.49 (1.76)	11.62 (2.08)	24.18 (1.63)	0.043
NOx (µM) ^a	10.23 (1.74)	17.44 (2.23)	15.44 (1.79)	0.075
NOx/Protéines ^a	2.83 (2.43)	3.07 (3.13)	2.18 (2.51)	0.324

FeNO_{0.05}: Fraction exhalée du NO à 50 ml/s; NOx: Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

NR : modèle non applicable

p: Kruskal Wallis (p<0.05)

^a résultats présentés en valeur moyenne géométrique (écart-type géométrique)

^b BOD: index composite intégrant l'index de masse corporelle, le VEMS, le score de dyspnée

Le tableau présenté ci-dessus (**Tableau 19**) résume les niveaux de biomarqueurs dans l'air exhalé en fonction de l'index de BOD par rapport aux témoins. Rappelons que cet index est prédictif des hospitalisations pour exacerbation chez les patients atteints de BPCO (154).

L'étude des biomarqueurs dans cette population retrouve une différence significative sur le niveau du 8-isoprostane dans les EBC qui est plus élevé chez les sujets BPCO ayant un index BOD>2. En ne prenant que les malades, la différence reste significative (p=0.039) avec des taux plus élevés chez les patients les plus à risque d'exacerbation. Il existe une tendance sur les NOx plus élevés chez les sujets atteints de BPCO par rapport aux témoins mais pas entre les deux groupes BPCO.

III.3.2.4.2.4 Étude de la distension thoracique chez les patients BPCO

Tableau 20. Résultats des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé chez les témoins et BPCO en fonction de la distension fonctionnelle

	Témoins n=48	BPCO Non distendus n=7	BPCO Distendus n=13	p
FeNO _{0.05} (ppb) ^a	10.51 (2.06)	8.93 (1.16)	9.20 (2.86)	0.820
NO _{bronchique} (nL/min) ^a	28.48 (2.11)	NA	55.57 (2.95)	
FeNO _{alvéolaire} (ppb) ^a	2.47 (1.84)	NA	2.95 (2.89)	
Protéines (µg/mL) ^a	3.61 (2.35)	6.14 (2.49)	6.25 (2.64)	0.084
8-Isoprostane (pg/mL) ^a	18.49 (1.76)	11.99 (1.50)	19.46 (2.24)	0.088
NOx (µM) ^a	10.23 (1.74)	15.73 (2.36)	17.11 (1.92)	0.066
NOx/Protéines ^a	2.83 (2.43)	2.56 (4.13)	2.74 (2.35)	0.946

FeNO_{0.05}: Fraction exhalée du NO à 50 ml/s; NOx: Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

NR : modèle non applicable

p: Kruskal Wallis (p<0.05)

^a résultats présentés en valeur moyenne géométrique (écart-type géométrique)

Le tableau présenté ci-dessus (**Tableau 20**) résume les niveaux de biomarqueurs dans l'air exhalé chez les patients BPCO en fonction de la distension thoracique (168) par rapport aux témoins.

Parmi les BPCO, le 8-isoprostane est plus élevé chez les BPCO distendus (p=0.097).

Sur les niveaux des NOx, une tendance apparaît avec des valeurs plus hautes chez les patients distendus. Cette différence n'apparaît pas lorsqu'on considère des patients entre eux (p=0.843).

III.3.2.4.2.5 Effet de la corticothérapie inhalée chez les patients BPCO

Tableau 21. Résultats des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé chez les témoins et BPCO en fonction du traitement par corticoïdes inhalés (ICS)

	Témoins n=48	BPCO ICS - n=11	BPCO ICS + n=9	p
FeNO _{0.05} (ppb) ^a	10.51 (2.06)	11.50 (1.91)	6.81 (2.77)	0.489
NO _{bronchique} (nL/min) ^a	28.48 (2.11)	54.47 (3.49)	34.21 (2.70)	0.585
FeNO _{alvéolaire} (ppb) ^a	2.47 (1.84)	3.85 (3.01)	1.66 (1.55)	0.525
Protéines (µg/mL) ^a	3.61 (2.35)	4.58 (2.28)	9.01 (2.59)	0.017
8-Isoprostane (pg/mL) ^a	18.49 (1.76)	12.56 (1.98)	22.16 (1.95)	0.087
NOx (µM) ^a	10.23 (1.74)	13.54 (2.01)	21.33 (1.96)	0.022
NOx/Protéines ^a	2.83 (2.43)	2.95 (3.02)	2.37 (2.78)	0.513

FeNO_{0.05}: Fraction exhalée du NO à 50 ml/s; NOx: Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

p: Kruskal Wallis (p<0.05)

^a résultats présentés en valeur moyenne géométrique (écart-type géométrique)

Le tableau présenté ci-dessus (**Tableau 21**) résume les niveaux de biomarqueurs dans l'air exhalé du groupe BPCO en fonction du traitement de la pathologie par corticothérapie inhalée (ICS) par rapport aux témoins. Une tendance apparaît sur les niveaux de 8-isoprostane plus bas chez les patients ICS -. Cette même tendance persiste si on ne considère que les malades (p=0.061) avec des valeurs plus élevées chez les patients ICS+. Concernant les NOx et les protéines, on met en évidence des valeurs plus importantes chez les patients ICS + avec une tendance uniquement pour les protéines lorsqu'on considère uniquement les malades.

III.3.2.4.3 Pneumopathies interstitielles diffuses (PID)

Tableau 22. Caractéristiques générales de la sous population PID

	PID n=27	FPI vs autres PID			Bronchectasie de traction		
		Autres PID n=13	FPI n=14	p	Non n=12	Oui n=15	p
Age ^b (ans)	56.4 (15.2)	49.2 (14.0)	63.0 (13.6)	0.014	49.7 (16.0)	61.7 (12.7)	0.043
BMI ^b (kg/m ²)	28.4 (5.2)	28.08 (5.54)	28.63 (5.04)	0.961	26.53 (5.45)	29.83 (4.64)	0.092
CVL ^a	0.88 (0.21)	0.85 (0.20)	0.80 (0.18)	0.610	0.95 (0.19)	0.73 (0.12)	0.001
VEMS ^a	0.59 (0.22)	0.82 (0.22)	0.82 (0.18)	0.577	0.90 (0.21)	0.75 (0.16)	0.075
VEMS/CVL ^a	0.73 (0.13)	1.00 (0.11)	1.06 (0.11)	0.126	1.00 (0.09)	1.06 (0.12)	0.188
DEM ₂₅₋₇₅ ^a	0.27 (0.15)	0.66 (0.29)	0.86 (0.39)	0.152	0.73 (0.25)	0.79 (0.42)	0.942
VR ^a	1.50 (0.48)	0.75 (0.21)	0.69 (0.23)	0.627	0.82 (0.25)	0.64 (0.16)	0.102
CRF ^a	1.15 (0.30)	0.68 (0.12)	0.70 (0.20)	0.734	0.75 (0.16)	0.65 (0.16)	0.107
CPT ^a	1.07 (0.15)	0.79 (0.14)	0.74 (0.19)	0.482	0.88 (0.16)	0.67 (0.11)	0.001
VR/CPT ^b	0.45 (0.14)	0.32 (0.07)	0.34 (0.07)	0.452	0.32 (0.08)	0.34 (0.06)	0.367
TLCO ^a	0.82 (0.19)	0.58 (0.18)	0.52 (0.14)	0.190	66.00 (11.88)	46.67 (13.91)	0.002
K ^b	4.69 (0.91)	4.06 (1.01)	3.70 (1.17)	0.264	4.39 (0.88)	3.46 (1.09)	0.015
DLNO ^b	122.52 (44.91)	80.57 (25.27)	59.09 (21.21)	0.027	76.92 (29.17)	65.71 (21.84)	0.307

PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses ; FPI: Fibrose pulmonaire idiopathique

CVL: capacité vitale lente; VEMS, volume expiratoire maximum en 1s; CPT: capacité pulmonaire totale; DEM₂₅₋₇₅: débit expiratoire maximal médian; VR: volume résiduel; CRF: capacité résiduelle fonctionnelle; TLCO: transfert du CO en apnée; K: Coefficient de transfert du CO; DLNO: capacité de transfert du monoxyde d'azote

p: tests non paramétriques (p<0.05)

^a Résultats présentés sous forme de rapport valeurs observées/valeurs prédites, moyenne (écart-type)

^b moyenne (écart-type)

Dans la population de patients présentant une pneumopathie interstitielle, nous avons identifié plus particulièrement les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) par rapport aux autres PID et ceux présentant ou non une image scanographique de type bronchectasie de traction. Le **Tableau 22** présente les caractéristiques générales et EFR de ces populations.

Concernant les patients atteints de FPI (n=14), le diagnostic formel repose sur l'association d'un profil radio clinique évocateur et d'un aspect histologique de pneumopathie interstitielle commune. Cette entité clinique rare représente 60% des pneumopathies interstitielles diffuses idiopathiques d'évolution chronique et correspond à la plus sévère d'entre elles. Son traitement est souvent difficile avec une médiane de survie à 3 ans de 50% (169). La FPI débute rarement avant 50 ans

(entre 60 et 70 ans) ce qui apparaît bien dans notre population avec un groupe FPI significativement plus âgé ($p=0.014$) par rapport aux autres PID.

La présence d'image scanographique de bronchectasie de traction ($n=15$) témoigne d'une fibrose irréversible et d'un stade avancé. Les patients présentant de telles lésions dans le groupe PID sont plus âgés et ont une CVL, une CPT et un TLCO moyens inférieurs aux patients PID sans bronchectasie indiquant un stade plus évolué de la pathologie.

III.3.2.4.3.1 Corrélation entre Biomarqueurs et EFR chez les patients PID

L'étude des corrélations des biomarqueurs de l'air exhalé chez les patients présentant une PID avec les EFR retrouve une corrélation négative faible et peu significative entre le TLCO et le $\text{FeNO}_{0.05}$ ($r=-0.23$; $p(r)= 0.081$) alors qu'il existe un lien plus fort entre le $\text{NO}_{\text{alvéolaire}}$ et le TLCO ($r=-0.54$; $p(r)= 0.0002$), le VR ($r=-0.48$; $p(r)= 0.001$) et la CPT ($r=-0.46$; $p(r)= 0.001$).

III.3.2.4.3.2 Étude chez les PID selon la présence d'une image de bronchectasie de traction au scanner

Tableau 23. Résultats des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé chez les témoins et PID en fonction de la présence d'une image scanographique de bronchectasie de traction

	Témoins n=48	PID Bronchectasie - n=12	PID Bronchectasie + n=15	p
FeNO _{0.05} (ppb) ^a	10.51 (2.06)	11.64 (1.60)	25.11 (1.35)	0.002
NO _{bronchique} (nL/min) ^a	28.48 (2.11)	24.49 (1.71)	57.58 (1.82)	0.033
FeNO _{alvéolaire} (ppb) ^a	2.47 (1.84)	4.66 (1.67)	7.15 (1.94)	0.001
Protéines (µg/mL) ^a	3.61 (2.35)	4.35 (1.48)	5.82 (1.48)	0.055
8-Isoprostane (pg/mL) ^a	18.49 (1.76)	7.92 (2.71)	16.04 (1.60)	0.008
NOx (µM) ^a	10.23 (1.74)	8.36 (2.26)	12.44 (1.80)	0.175
NOx/Protéines ^a	2.83 (2.43)	2.04 (2.21)	1.99 (1.74)	0.175

PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses

FeNO_{0.05}: Fraction exhalée du NO à 50 ml/s; NOx: Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

p: Kruskal Wallis

^a résultats présentés en valeur moyenne géométrique (écart-type géométrique)

Le tableau présenté ci-dessus (**Tableau 23**) présente les niveaux de biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé ou dosés dans les EBC de patients atteints de PID sans (BE-) ou avec (BE+) signe scanographique de bronchectasie de traction.

On relève une différence significative pour le FeNO_{0.05}, le NO_{bronchique} et le NO_{alvéolaire} avec des valeurs plus élevées chez les patients BE+. Lorsque l'on considère uniquement les patients, les valeurs restent augmentées chez les patients BE+ pour le FeNO_{0.05} (p=0.004) et le NO_{bronchique} (P=0.024).

Concernant les EBC, le niveau du 8-isoprostane chez les patients BE - est diminué par rapport aux BE + et aux témoins (p=0.008). On note une tendance pour le niveau des protéines totales qui est plus bas chez les patients par rapport aux BC+ et BC- (p=0.055).

III.3.2.4.3.3 Étude selon le diagnostic de fibrose pulmonaire idiopathique

Tableau 24. Résultats des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé chez les PFI vs autres PID

	Témoins n=48	Autres PID n=13	FPI n=14	p
FeNO _{0.05} (ppb) ^a	10.51 (2.06)	15.92 (1.83)	18.74 (1.65)	0.036
NO _{bronchique} (nL/min) ^a	28.48 (2.11)	31.99 (1.90)	44.48 (2.24)	0.413
FeNO _{alvéolaire} (ppb) ^a	2.47 (1.84)	6.49 (2.02)	4.68 (1.48)	0.001
Protéines (µg/mL) ^a	3.61 (2.35)	5.11 (1.58)	5.15 (1.46)	0.118
8-Isoprostane (pg/mL) ^a	18.49 (1.76)	7.95 (2.54)	16.81 (1.63)	0.004
NOx (µM) ^a	10.23 (1.74)	7.53 (2.04)	14.11 (1.80)	0.026
NOx/Protéines ^a	2.83 (2.43)	1.53 (1.79)	2.59 (1.88)	0.043

PID: Pneumopathies Interstitielles Diffuses; FPI: Fibrose pulmonaire idiopathique

FeNO_{0.05}: Fraction exhalée du NO à 50 ml/s; NOx: Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

p: Kruskal Wallis (p<0.05)

^a résultats présentés en valeur moyenne géométrique (écart-type géométrique)

Le tableau présenté ci-dessus (**Tableau 24**) présente les niveaux de biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé ou dosés dans les EBC de patients atteints de PID de type fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) en comparaison des autres PID et des témoins.

On relève une différence significative pour le FeNO_{0.05} et le NO_{alvéolaire} avec des valeurs plus élevées chez les patients FPI.

Pour les biomarqueurs dosés dans les EBC, l'augmentation chez les malades FPI est très significative pour le 8-isoprostane et significative pour les NOx. Lorsque l'on considère le groupe de malades atteint de PID, l'augmentation reste significative pour les deux biomarqueurs (respectivement (p=0.027) et (p=0.017)).

III.3.2.4.4 Sclérodémie

Tableau 25. Caractéristiques générales de la sous population sclérodémie

	SSc n=27	Diffuse vs Limitée			Fibrose pulmonaire			Corticothérapie orale		
		Diffuse n=16	Limitée n=8	p	Non n=15	Oui n=11	p	Non n=18	Oui n=8	p
Age ^b (ans)	55.0 (11.9)	56.5 (13.5)	53.8 (11.5)	0.580	53.5 (8.9)	56.6 (15.8)	0.640	52.7 (11.7)	59.6 (12.3)	0.211
BMI ^b (kg/m ²)	24.5 (6.5)	22.56 (3.56)	25.68 (7.88)	0.257	26.09 (8.20)	22.28 (2.68)	0.324	25.39 (7.66)	22.42 (2.90)	0.453
Tabagisme ^c (PA)	40.4 (23.8)	20.0 (14.1)	5.0 (4.2)	0.245	6.7 (4.2)	30.0 (0.0)	0.371	6.7 (4.2)	30.0 (0.0)	0.371
CVL ^a	0.91 (0.20)	0.94 (0.15)	1.00 (0.21)	0.384	1.03 (0.11)	0.91 (0.25)	0.177	0.99 (0.17)	0.96 (0.24)	0.889
VEMS ^a	0.57 (0.19)	0.90 (0.25)	0.96 (0.20)	0.617	0.97 (0.20)	0.90 (0.24)	0.213	0.95 (0.17)	0.90 (0.31)	0.718
VEMS/CVL ^a	0.66 (0.17)	1.06 (0.14)	1.01 (0.06)	0.235	1.02 (0.09)	1.05 (0.11)	0.835	1.03 (0.07)	1.04 (0.15)	0.802
DEM ₂₅₋₇₅ ^a	0.22 (0.11)	0.94 (0.47)	0.74 (0.24)	0.217	0.81 (0.31)	0.82 (0.41)	0.483	0.81 (0.25)	0.83 (0.53)	0.781
VR ^a	1.65 (0.47)	0.95 (0.41)	1.01 (0.20)	0.188	1.00 (0.17)	0.98 (0.41)	0.500	0.99 (0.19)	1.00 (0.47)	0.697
CRF ^a	1.41 (0.37)	0.86 (0.23)	0.95 (0.14)	0.097	0.92 (0.12)	0.92 (0.25)	0.755	0.91 (0.15)	0.93 (0.26)	0.934
CPT ^a	1.15 (0.18)	0.90 (0.11)	0.98 (0.16)	0.097	0.99 (0.12)	0.89 (0.17)	0.194	0.96 (0.15)	0.92 (0.16)	0.560
VR/CPT ^b	0.50 (0.11)	0.37 (0.10)	0.38 (0.08)	0.414	0.37 (0.05)	0.39 (0.12)	0.795	0.38 (0.07)	0.39 (0.11)	0.978
TLCO ^a	0.60 (0.21)	0.62 (0.12)	0.70 (0.18)	0.206	0.74 (0.14)	0.58 (0.14)	0.019	0.70 (0.17)	0.61 (0.15)	0.304
K ^b	3.40 (1.18)	3.80 (0.80)	4.03 (0.75)	0.414	4.24 (0.71)	3.54 (0.65)	0.017	4.07 (0.72)	3.67 (0.82)	0.191
DLNO ^b	79.39 (25.31)	86.20 (21.22)	93.89 (19.87)	0.350	99.09 (15.79)	79.17 (21.06)	0.014	95.95 (19.93)	78.71 (16.42)	0.065

SSc: Sclérodémie

CVL: capacité vitale lente; VEMS, volume expiratoire maximum en 1s; CPT: capacité pulmonaire totale; DEM₂₅₋₇₅: débit expiratoire maximal médian; VR: volume résiduel; CRF: capacité résiduelle fonctionnelle; TLCO: transfert du CO en apnée; K: Coefficient de transfert du CO; DLNO: capacité de transfert du monoxyde d'azote

p: tests non paramétriques (p<0.05)

^a Résultats présentés sous forme de rapport valeurs observées/valeurs prédites, moyenne (écart-type)

^b moyenne (écart-type)

^c en paquets-année

Nous avons étudié la population atteinte de sclérodémie selon différentes caractéristiques. Nous avons différencié les patients ayant une atteinte limitée (atteinte cutanée périphérique ne dépassant pas le niveau des genoux ou des coudes) de l'atteinte diffuse (156). La présence ou non d'une complication pulmonaire de type pneumopathie interstitielle qui atteint 75% des patients est prise en compte sachant que cette atteinte est moins sévère que la fibrose pulmonaire idiopathique étudiée dans le chapitre précédent. Elle constitue cependant l'une des deux causes de mortalité chez ces patients. La surveillance de l'apparition de cette complication est donc essentielle avec des EFR pratiquées tous les ans (170). Une surveillance particulière d'une diminution du transfert du CO (TLCO) est recherchée. Depuis 2010 est évoqué l'intérêt de l'utilisation du NO exhalé et plus particulièrement

le $\text{NO}_{\text{alvéolaire}}$ (10,171,172). Enfin, nous avons tenu compte de la prise d'anti-inflammatoires tels que les corticoïdes oraux qui n'est indiquée que pour les formes débutantes aiguës œdémateuses et lors de certaines manifestations inflammatoires notamment ostéo articulaires ou musculaires.

Le **Tableau 25** présente les différentes caractéristiques générales et EFR de ces groupes. On note une diminution du transfert du CO avec un K et un TLCO moyen plus bas sur la population ayant une atteinte pulmonaire par rapport aux autres patients atteints de sclérodermie.

III.3.2.4.4.1 Corrélation entre Biomarqueurs et EFR chez les patients atteints de sclérodermie

L'étude des corrélations des biomarqueurs de l'air exhalé (NO exhalé et EBC) chez les patients présentant une sclérodermie avec les EFR retrouve une corrélation inverse faible mais significative entre les indicateurs du transfert du CO (TLCO et K) et le $\text{NO}_{\text{alvéolaire}}$ (respectivement $r=-0.33$; $p(r)=0.019$ et $r=-0.30$; $p(r)=0.037$).

III.3.2.4.4.2 Étude selon le caractère diffus ou limité de la sclérodermie

Tableau 26. Résultats des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé chez les sclérodermies diffuses en comparaison des sclérodermies limitées et des témoins

	Témoins n=48	SSc diffuse n=16	SSC limitée n=10	p
FeNO _{0.05} (ppb) ^a	10.51 (2.06)	11.81 (1.97)	13.05 (2.09)	0.901
NO _{bronchique} (nL/min) ^a	28.48 (2.11)	23.86 (2.28)	25.40 (3.96)	0.932
FeNO _{alvéolaire} (ppb) ^a	2.47 (1.84)	4.53 (1.40)	5.40 (1.33)	<0.0001
Protéines (µg/mL) ^a	3.61 (2.35)	3.41 (1.65)	4.91 (2.47)	0.140
8-Isoprostane (pg/mL) ^a	18.49 (1.76)	22.77 (2.58)	11.43 (4.73)	0.400
NOx (µM) ^a	10.23 (1.74)	20.46 (2.24)	16.58 (2.36)	0.026
NOx/Protéines ^a	2.83 (2.43)	5.08 (1.63)	3.57 (1.82)	0.134

SSC: Sclérodermie

FeNO_{0.05}: Fraction exhalée du NO à 50 ml/s; NOx: Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

p: Kruskal Wallis (p<0.05)

^a résultats présentés en valeur moyenne géométrique (écart-type géométrique)

Le tableau ci-dessus (**Tableau 26**) résume les niveaux de biomarqueurs mesurés directement dans l'air exhalé ou dosés dans les EBC de patients atteints de sclérodermie diffuse (n=16) en comparaison avec les atteintes limitées (n=10) et les témoins. On observe une augmentation significative des NOx chez les patients atteints de sclérodermie diffuse. On observe également une augmentation très significative du NO_{alvéolaire} avec des valeurs plus importantes chez les patients par rapport aux témoins. Si l'on ne tient compte que des malades, aucune différence n'est retrouvée sur ces deux biomarqueurs entre les atteintes diffuses et limitées.

III.3.2.4.4.3 Étude selon la présence d'une atteinte pulmonaire

Tableau 27. Résultats des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé chez les témoins et sclérodermies sans et avec fibrose pulmonaire

	Témoins n=48	SSc Sans PID n=15	SSc Avec PID n=11	p
FeNO _{0.05} (ppb) ^a	10.51 (2.06)	14.01 (2.07)	10.95 (1.96)	0.663
NO _{bronchique} (nL/min) ^a	28.48 (2.11)	32.56 (3.13)	17.13 (3.04)	0.509
FeNO _{alvéolaire} (ppb) ^a	2.47 (1.84)	5.70 (1.32)	4.21 (1.33)	<0.0001
Protéines (µg/mL) ^a	3.61 (2.35)	4.56 (2.77)	4.08 (1.63)	0.487
8-Isoprostane (pg/mL) ^a	18.49 (1.76)	13.02 (5.21)	17.89 (2.50)	0.704
NOx (µM) ^a	10.23 (1.74)	18.88 (2.70)	16.81 (1.78)	0.032
NOx/Protéines ^a	2.83 (2.43)	3.96 (2.04)	4.12 (1.53)	0.261

SSc: Sclérodermie

FeNO_{0.05}: Fraction exhalée du NO à 50 ml/s; NOx: Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

p: Kruskal Wallis (p<0.05)

^a résultats présentés en valeur moyenne géométrique (écart-type géométrique)

Le tableau ci-dessus (**Tableau 27**) résume les niveaux de biomarqueurs mesurés directement dans l'air exhalé ou dosés dans les EBC de patients atteints de sclérodermie sans (n=15) ou avec (n=11) fibrose interstitielle par rapport aux témoins. Tout comme l'étude précédente, on observe une augmentation significative des NOx chez les patients. On observe également une augmentation très significative du NO_{alvéolaire} avec des valeurs plus faibles chez les témoins. Si l'on ne tient compte que des malades, une différence est retrouvée sur le FeNO_{alvéolaire} avec des valeurs plus importantes chez les patients sans fibrose pulmonaire (p=0.021).

III.3.2.4.4.4 Étude selon la prise de corticoïdes oraux

Tableau 28. Résultats des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé chez les témoins et sclérodermies sans et avec corticothérapie orale (CO)

	Témoins n=48	SSc Sans corticoïdes n=18	SSc Avec corticoïdes n=8	p
FeNO _{0.05} (ppb) ^a	10.51 (2.06)	13.52 (1.98)	10.95 (2.12)	0.556
NO _{bronchique} (nL/min) ^a	28.48 (2.11)	31.87 (2.89)	14.88 (3.40)	0.386
FeNO _{alvéolaire} (ppb) ^a	2.47 (1.84)	5.31 (1.37)	4.44 (1.35)	<0.0001
Protéines (µg/mL) ^a	3.61 (2.35)	4.35 (2.52)	4.26 (1.52)	0.612
8-Isoprostane (pg/mL) ^a	18.49 (1.76)	11.27 (4.42)	27.92 (2.35)	0.287
NOx (µM) ^a	10.23 (1.74)	16.03 (2.24)	23.27 (2.39)	0.021
NOx/Protéines ^a	2.83 (2.43)	3.91 (1.85)	4.34 (1.67)	0.258

SSc: Sclérodermie

FeNO_{0.05}: Fraction exhalée du NO à 50 ml/s; NOx: Oxydes d'azote (nitrates + nitrites)

p: Kruskal Wallis (p<0.05)

^a résultats présentés en valeur moyenne géométrique (écart-type géométrique)

Le tableau ci-dessus (**Tableau 28**) résume les niveaux de biomarqueurs mesurés directement dans l'air exhalé ou dosés dans les EBC de patients sous corticothérapie orale (n=8) ou non (n=18) par rapport aux témoins. Encore une fois, on observe une augmentation significative des NOx chez les patients. On observe également une augmentation très significative du NO_{alvéolaire} avec des valeurs plus faibles chez les témoins. Si l'on ne tient compte que des malades, aucune différence n'est retrouvée sur ces deux biomarqueurs.

Synthèse des résultats des niveaux des biomarqueurs mesurés dans l'air exhalé en fonction des groupes étudiés et de leurs caractéristiques

Groupes	Critère	FeNO _{0.05}	FeNObr	FeNOalv	NOx	NOx/Protéines totales	8-isoprostane	Protéines totales
Témoin	Age	-	-	-	-	-	-	-
	Tabac	-	-	-	-	-	-	-
	Atopie	-	-	-	-	-	↓ (p=0.032)	-
Asthme	vs Témoins ^H	↑ (p=0.044)	↑ (p=0.043)	-	-	-	-	-
	Contrôle ^F : mauvais versus partiel	-	-	-	-	↓ (p=0.038)	-	-
	Sévérité ^S : GINA IV versus GINA III	-	-	↓ (p=0.033)	-	-	-	-
BPCO	vs Témoins ^H	-	-	-	↑ (p=0.004)	-	-	-
	Sévérité ^S : GOLD III versus GOLD II	-	-	-	-	-	-	-
	BOD>2 versus BOD<2*	-	-	-	-	-	↑ (p=0.039)	-
	Distendus versus non distendus	-	-	-	-	-	-	-
	ICS+ versus ICS-	-	-	-	-	-	-	-
PID	vs Témoins ^H	-	-	↑ (p=0.0001)	-	-	-	-
	Bronchectasie + versus bronchectasie -	↑ (p=0.004)	↑ (p=0.024)	-	-	-	-	-
	FPI	↑ (p=0.036)	-	↑ (p=0.001)	↑ (p=0.026)	↑ (p=0.043)	↑ (p=0.004)	-
Sclérodémie	vs Témoins ^H	-	-	↑ (p=0.0003)	↑ (p=0.006)	-	-	-
	Diffuse versus Limitée	-	-	-	-	-	-	-
	Fibrose + versus Fibrose -	-	-	↓ (p=0.021)	-	-	-	-
	CO + versus CO -	-	-	-	-	-	-	-

FeNO_{0.05}: Fraction exhalée du NO au débit expiratoire de 50ml/s; FeNOalv: FeNO alvéolaire; FeNObr: FeNO bronchique; NOx: Oxydes d'azote; ICS: corticothérapie inhalée; CO: Corticothérapie Orale; FPI: Fibrose Pulmonaire Idiopathique; PID: Pneumopathie Interstitielle Diffuse.

^Hvs témoin: Etude des biomarqueurs de l'air exhalé sur les 5 groupes avec prise en compte des cofacteurs tabac et atopie

^F Mauvais contrôle: Score de Juniper>2.2

^SClassification GINA 2007

^SClassification de GOLD 2001

*BOD: Index composite prédictif d'hospitalisation pour exacerbation intégrant l'indice de masse corporelle, le VEMS et le score de dyspnée. Risque plus important si BOD>2

Discussion

Ce travail a permis la mise en place d'une nouvelle technique d'évaluation de l'inflammation pulmonaire dans notre laboratoire et notre équipe d'accueil. Il s'agit de la méthode des condensats de l'air exhalé, complémentaire de l'étude du NO exhalé déjà utilisée dans notre routine clinique, en explorations fonctionnelles respiratoires. Nous sommes une des premières équipes françaises, grâce au financement de l'ANSES, de l'ANR et du ministère de la santé (PHRC), à utiliser cette technique sur des populations homogènes de patients mais également de salariés exposés à des nuisances professionnelles et environnementales.

Les EBC font l'objet d'un intérêt croissant car ils permettent d'accéder de manière totalement non invasive aux phénomènes physiopathologiques pulmonaires par le dosage des biomarqueurs de l'inflammation et du stress oxydant. Ces biomarqueurs sont retrouvés en faible quantité et souvent dans les limites de détection des techniques traditionnelles de dosage. Dans ce contexte, notre travail a eu pour objectif premier de déterminer la faisabilité, la stabilité et la reproductibilité du recueil jusqu'aux dosages des biomarqueurs dans les EBC en tenant compte des difficultés méthodologiques liées à ce nouveau liquide biologique (18).

Notre recherche a permis de standardiser et valider le recueil, la conservation et l'analyse des biomarqueurs d'intérêt. Les essais ont tout d'abord porté sur le choix des matériaux. Nous avons retenu le dispositif EcoScreen parmi les trois dispositifs testés pour son rendement supérieur en termes de volume de recueil d'EBC mais également de biomarqueurs. Une température de condensation plus basse (-20°C) sur cet appareil et un revêtement spécifique en téflon expliquent en partie ce volume supérieur de condensat et la récupération plus importante de protéines et de NOx (65). Le volume de condensat est un facteur important lors du dosage de plusieurs biomarqueurs nécessitant une plus grande quantité d'EBC surtout quand le dosage est réalisé en «triplicate», ainsi que le suggère les recommandations (3).

Pour notre recherche, ce dispositif est préféré au dispositif R-tube qui reste néanmoins intéressant en collecteur portatif pour les études épidémiologiques en entreprise pour le suivi des salariés ou au domicile du patient.

D'autres essais nous ont permis de déterminer l'agent coquant du système de recueil, permettant d'optimiser la récupération des biomarqueurs dans le recueil (98,173). Nous avons défini sa concentration qui doit être suffisante mais non délétère pour les analyses. Pour la standardisation du recueil, nous avons retenu la mesure du volume expiré cumulé plutôt que la mesure du temps de recueil.

Les études de reproductibilité sur le dosage des biomarqueurs dans les EBC montrent, en effet, une variabilité importante des volumes entre deux recueils lorsque la standardisation est faite sur le temps (68,69). Nous avons montré que, chez les témoins, le volume d'EBC après 20 minutes de recueil est variable. Cette

variabilité est diminuée lorsqu'on standardise le recueil sur le volume d'air expiré total (19).

La standardisation et la validation du dosage de chaque biomarqueur a nécessité des études de reproductibilité intra assay et intra individu mais également l'étude de la stabilité de ces biomarqueurs. Les résultats de la partie méthodologique de ce travail a permis de valider le dosage des protéines totales, des NOx, du 8-isoprostane et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec une détectabilité et une reproductibilité satisfaisantes qui nous donnent aujourd'hui la possibilité d'évaluer ces biomarqueurs dans les EBC de patients présentant déjà une pathologie pulmonaire, de salariés ou de sujets exposés à des nuisances professionnelles ou environnementales.

L'application de notre méthodologie dans l'étude clinique a montré la pertinence des biomarqueurs dans les pathologies étudiées. La comparaison des niveaux de biomarqueurs dans les EBC (protéines totales, NOx et 8-isoprostane) associée à l'étude du NO exhalé (FeNO) entre les témoins et les quatre groupes de sujets présentant une pathologie inflammatoire a montré des niveaux de concentration plus importants de certains biomarqueurs chez les malades avec des profils différents selon la pathologie.

Nous avons développé le dosage des protéines totales. Il s'agit d'une analyse simple, rapide et peut coûteuse. La détectabilité est bonne de même que la reproductibilité intra assay. La variation intra individu est satisfaisante mais doit être améliorée. Son interprétation dans les EBC n'est pas encore clairement définie (59). Pour certains auteurs, il n'y aurait pas de différence significative entre les sujets sains et ceux présentant une affection pulmonaire aiguë (71). Certaines études ont montré un effet du tabac avec une différence significative des protéines totales entre des fumeurs sains et des non fumeurs (72). Dans ce cas, les protéines totales sont considérées comme des biomarqueurs de l'inflammation à part entière. Pour d'autres, aucune différence n'est retrouvée pour les protéines totales sur ce même type de population (138,161). Ce biomarqueur servirait alors à diminuer l'effet de dilution du condensat en rapportant les biomarqueurs dosés au taux de protéines totales dans l'EBC.

Dans notre étude, il existe un effet groupe pour les protéines totales en tenant compte du tabac et de l'atopie ($p=0.048$) avec une augmentation chez les patients BPCO sous corticothérapie ($p=0.017$) et une tendance plus élevée pour les patients BPCO et asthmatiques les plus atteints par rapport aux témoins en terme de gravité de la maladie et de contrôle. Le rapport des NOx/protéines n'a que peu d'intérêt dans notre population. Nous pensons que le dosage des protéines constitue un marqueur de l'inflammation chronique et non un marqueur de dilution comme l'indique le développement récent des analyses protéomiques qui sont plus adaptées à ce type de biomarqueur. On retrouve par ces techniques de nombreuses protéines dans les EBC avec la possibilité de déterminer les protéines les plus représentées même si l'on recherche surtout une modification du profil protéique selon la pathologie (173,174).

Concernant l'étude des NOx, les patients de notre étude atteints de sclérodémie et de BPCO ont des niveaux significativement plus élevés que les témoins. Les niveaux de biomarqueur ont une tendance plus élevée chez les patients asthmatiques par rapport aux témoins mettant en évidence l'atteinte pulmonaire des malades au travers du stress oxydant (80,117,162). Les oxydes d'azote tels que les nitrites (NO_2^-) ou les nitrates (NO_3^-) sont produits à partir du NO formé à l'occasion d'un processus inflammatoire. Sa réaction avec des espèces radicalaires issues du stress oxydant comme l'anion superoxyde forme un anion peroxy-nitrique (ONOO^-) qui peut former des nitrates en présence de nitrites ou encore interagir avec certains acides aminés formant par exemple la 3-nitrotyrosine. Ce stress nitrosant peut altérer la fonction de la protéine (74). La production de NOx est donc augmentée à l'occasion d'une inflammation et d'un stress oxydant mais peut varier en fonction de l'atteinte pulmonaire et des traitements administrés (75). Les données de la littérature sont contradictoires en ce qui concerne les effets du tabac (72,76,162). Notre étude montre une corrélation négative modérée entre la consommation cumulée de tabac et les NOx. Chez les patients asthmatiques, nous montrons une tendance à l'élévation des NOx dans les EBC du groupe de patients asthmatiques les moins atteints en termes de gravité et de contrôle. Notre hypothèse est que des niveaux inférieurs du NO exhalé ou de ses dérivés peuvent être retrouvés chez les malades les plus sévères ou les moins contrôlés du fait d'un rétrocontrôle sur les NO synthases inductibles (iNOs) lors des inflammations chroniques avec activation de médiateurs anti-inflammatoires. Cette diminution peut s'expliquer également par un traitement plus important par corticostéroïdes inhalés qui augmente avec la sévérité ou le manque de contrôle de l'asthme. Là encore, un rétrocontrôle inhibiteur sur les iNOs s'opère (175). Les niveaux de NOx des patients présentant une fibrose

pulmonaire idiopathique parmi nos patients atteints de pneumopathie interstitielle diffuse sont supérieurs à ceux des autres PID mais relativement proches de ceux des témoins comme d'autres auteurs l'ont déjà publié (68,176). Ces résultats rejoignent ceux d'autres équipes ayant spécifiquement étudié la fibrose pulmonaire idiopathique (104,177). Ce type de pathologie est associé à une inflammation et un stress oxydant pulmonaire plus important que les autres syndromes interstitiels avec une cellularité lors de l'étude du LBA plus élevée (178).

Le dosage des NOx est un biomarqueur peu spécifique mais qui renseigne sur le caractère aigu ou chronique de l'atteinte inflammatoire ou oxydative. Des taux de nitrites élevés sont retrouvés dans les EBC de salariés exposés au chrome lorsqu'ils sont comparés à des sujets non exposés (77,78). Dans une de ces études, les auteurs trouvent une augmentation significative des concentrations de nitrites et de nitrates en fin de poste chez les salariés ne portant pas de protection respiratoire confirmant l'importance du port de protection individuelle chez les soudeurs. L'association de ce dosage à d'autres biomarqueurs plus spécifiques peut aider à comprendre les mécanismes physiopathologiques oxydatifs des atteintes pulmonaires (62,64). Notre recherche se poursuit également sur le dosage d'autres composés dérivés du NO tels que l'ion peroxy-nitrique et la 3-nitrotyrosine afin de compléter la physiopathologie du stress nitrosant.

Le 8-isoprostane est un biomarqueur classiquement augmenté lors des atteintes pulmonaires et plus spécifiquement quand la part inflammatoire est aigüe et importante (114). Nous avons démontré qu'il s'agit d'un marqueur stable une fois le recueil des condensats effectué, à condition de le stocker à -80°C. Sa détectabilité est tout à fait satisfaisante mais sa variabilité intra individu doit être diminuée notamment par l'utilisation de techniques de dosage plus spécifiques telles que l'HPLC-MS/MS (5,114–116). Il peut augmenter avec l'âge qui est donc un cofacteur à prendre en compte lors des études si les âges sont très dispersés (110). Notre population étant relativement jeune et homogène, nous n'avons pas mis en évidence cet effet âge. Nous ne trouvons pas d'effet tabac qui est inconstant selon les études (111,116,163,164). Notre population de témoins ne montre pas des niveaux aberrants de 8-isoprostane (55), mais ces niveaux sont relativement élevés par rapport à d'autres auteurs (109,179–181) ne permettant pas la mise en évidence de différence significative avec les asthmatiques et les patients atteints de BPCO de notre étude. L'élévation du taux d'isoprostane dans les EBC est souvent démontrée dans la littérature chez les asthmatiques (54,55,73,88,96–102,182), nous ne retrouvons pas cette augmentation sur l'ensemble de la population ni sur la comparaison des sous groupes d'asthme avec les témoins. L'augmentation du 8-isoprostane chez les patients BPCO par rapport aux témoins est habituellement décrite (45,96,103,115) avec une relation avec la distension et l'index BODE incluant le test de marche (168) même si, comme dans notre travail, le lien avec la sévérité n'est pas établi (115). Le niveau du 8-isoprostane dans les EBC de notre population apparaît plus élevé chez les patients BPCO distendus ($p=0.097$) et les sujets BPCO ayant un index BOD >2 par rapport aux patients ayant un index BOD <2 ($p=0.039$). Cet index est prédictif des hospitalisations pour exacerbation ce qui est finalement

plus pertinent que l'étude des patients ayant eu une exacerbation dans les 12 derniers mois stabilisée 3 mois avant l'inclusion et pour lesquels un traitement antibiotique aura été prescrit entraînant une baisse du 8-isoprostane (125). La corticothérapie inhalée augmente le niveau des 8-isoprostanes dans notre étude chez les patients BPCO ($p=0.061$) ce qui n'est pas classique puisque ce biomarqueur n'est généralement pas modifié par la corticothérapie (125). Ce résultat s'explique néanmoins par le fait que les patients atteints de BPCO pour lesquels une corticothérapie est instaurée sont généralement à haut risque d'exacerbation. L'étude du 8-isoprostane est réalisée moins fréquemment chez les patients atteints de pneumopathie interstitielle diffuse (104). Nous retrouvons une augmentation du 8-isoprostane chez les patients présentant une bronchiectasie de traction ou atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) par rapport aux autres PID. Ces deux caractéristiques sélectionnent les patients les plus atteints; ces résultats sont en faveur d'une augmentation du stress oxydant chez les patients ayant une fibrose évoluée (104). Une augmentation des concentrations de ce biomarqueur est également retrouvée chez des patients atteints de silicose et d'asbestose comparés aux sujets sains (92–95). Le 8-isoprostane est également un biomarqueur précoce dans la pathogénèse comme le démontrent des études sur des populations exposées à des toxiques professionnels et environnementaux tels que l'amiante, les poussières agricoles et l'ozone (7,107–109). Les études concernant des sujets atteints de pathologies pulmonaires ou exposés à des toxiques professionnels ou environnementaux retrouvent pour la plupart une augmentation des concentrations de 8 Isoprostane dans les EBC qui est souvent associée à l'étude du FeNO.

L'étude du NO exhalé (FeNO) dans notre population montre des niveaux de FeNO_{0.05} (p=0.044) et de NO_{bronchique} (p=0.043) plus élevés chez les asthmatiques par rapport aux témoins. Le FeNO_{alvéolaire} est très augmenté dans les groupes PID (p=0.0001) et sclérodermie (p=0.0003) par rapport aux témoins. Les patients asthmatiques de notre population ont un FeNO_{0.05} moyen inférieur à 25ppb, ce qui est une valeur relativement faible et inférieure au seuil récemment admis dans les recommandations (9). Ceci s'explique par l'effet de la corticothérapie inhalée prise par 96% des sujets asthmatiques de notre population et par le fait que ces patients sont inclus à distance d'une exacerbation. Conformément aux NOx, nous montrons une augmentation significative du FeNO_{0.05} et du NO_{bronchique} dans le groupe de patients les moins atteints en termes de gravité et de contrôle. Cette augmentation s'explique de la même façon que l'augmentation des NOx par un rétrocontrôle sur les iNOs des médiateurs anti inflammatoires dont la production augmente en cas d'inflammation chronique ou de prise de corticothérapie (175).

Sur notre population BPCO, l'étude du NO exhalé est sans particularité, quelque soit la caractérisation des malades. Ceci n'est pas conforme aux études réalisées chez les patients BPCO mais s'explique par le fait que nos patients sont inclus en dehors de toute exacerbation, le dernier épisode remontant au minimum à trois mois. Concernant la population présentant une pneumopathie interstitielle diffuse, nous montrons une augmentation du FeNO_{0.05} chez les patients atteints de PID par rapport aux témoins et spécifiquement du FeNO_{0.05} et du NO_{bronchique} chez les patients présentant une bronchectasie de traction (176,177). L'étude sur la population atteinte de sclérodermie nous permet de conforter l'augmentation du NO_{alvéolaire} chez ces patients par rapport aux témoins. Dans notre étude, seul le NO_{alvéolaire} peut différencier les patients avec et sans fibrose interstitielle. D'autres

auteurs retrouvent une augmentation spécifique du $\text{NO}_{\text{alvéolaire}}$ chez les patients atteints de sclérodermie sans différence entre les patients présentant une atteinte pulmonaire et les autres. Ils ne retrouvent pas de corrélation entre le $\text{NO}_{\text{alvéolaire}}$ et l'extension de la fibrose pulmonaire (10,171). Dans leur étude en 2012, Tiev *et al* définissent un seuil de 5.3ppb du $\text{NO}_{\text{alvéolaire}}$ au-delà duquel apparaissent les complications respiratoires avec une baisse de la CPT ou de la CVF (172).

Au total, ces premiers résultats sont encourageants et en accord avec les données de la littérature, même s'ils doivent être confirmés sur un effectif de patients plus important avec l'analyse complémentaire d'autres biomarqueurs dont le développement des techniques de dosage est en cours. Le dosage complémentaire des cytokines aura un intérêt pour conforter notre hypothèse qu'il existe un rétrocontrôle négatif sur la voie du NO et ses dérivés par activation du facteur de transcription NF-KappaB produisant des médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL1 β , le TNF α et le MIP1 α .

IV. Conclusion et Perspectives

L'exploration de l'air exhalé est un sujet de recherche actif du fait des avantages conférés. Notre travail s'inscrit dans la préoccupation actuelle des équipes travaillant sur ce sujet et vise à standardiser et optimiser le recueil, la conservation ainsi que les dosages des biomarqueurs dans les EBC. Cette standardisation est un point essentiel pour la constitution de valeurs de référence et la publication de recommandations pour une utilisation clinique de cette méthode. Il convient de finaliser la standardisation de la mesure des cytokines et du malondialdéhyde et d'explorer de nouveaux biomarqueurs produits lors du stress nitrosant tels que la 3-nitrotyrosine pour compléter les mécanismes physiopathologiques des atteintes pulmonaires étudiées.

Le développement de cette méthode non invasive et peu contraignante s'avère prometteuse en clinique médicale dans le suivi individuel de la maladie ou de son traitement comme lors d'études épidémiologiques respiratoires dans des populations ayant une exposition environnementale et/ou professionnelle (183). Le caractère non invasif de cette méthode permet un recueil des échantillons au domicile ou sur le lieu de travail.

La poursuite de notre recherche concerne, chez l'homme, le retentissement fonctionnel et l'inflammation respiratoires liés à l'exposition à des nuisances environnementales et/ou professionnelles.

Dans cette perspective, nous participons à une enquête épidémiologique de population sur la relation entre santé respiratoire et pollution atmosphérique d'origine industrielle. Cette étude doit permettre d'évaluer les effets de la pollution sur des marqueurs biologiques, dont les biomarqueurs du condensat afin de mieux connaître les relations entre le risque de troubles ventilatoires obstructifs (TVO) et la pollution atmosphérique d'origine industrielle.

L'étude des biomarqueurs de l'inflammation et du stress oxydant a un intérêt dans le suivi de sujets exposés (**Tableau 29**) en complément de l'imagerie et des EFR afin de détecter précocement les atteintes pulmonaires. Cette méthode trouve ainsi une place de choix lors du suivi de populations vulnérables, notamment lors de l'évaluation de l'efficacité des mesures de protection, voire des traitements préconisés. Dans ce cadre, l'étude de marqueurs d'exposition dans les EBC tels que les métaux lourds est en cours de développement par notre équipe et doit être évalué chez des populations exposées aux fumées de soudage d'une part, et d'autre part au béryllium.

De manière complémentaire au travail effectué chez des sujets malades ou exposées, notre équipe a développé un modèle animal expérimental avec exposition à des aéro-contaminants et recueil des condensats. Le développement du recueil du condensat chez l'animal présente le double avantage de pouvoir répéter facilement les recueils d'EBC à des fins méthodologiques et d'analyser expérimentalement chez celui-ci le retentissement respiratoire inflammatoire des différents composants des

aéro-contaminants testés. Chez des rats exposés de manière aiguë et chronique à l'ozone et au dioxyde d'azote, il permet d'étudier de manière non invasive les marqueurs de l'inflammation du poumon profond dans les EBC et de les comparer aux marqueurs dans le LBA. L'exposition aiguë à l'ozone et/ou au NO₂ représente une nuisance respiratoire ubiquitaire environnementale mais aussi professionnelle bien documentée sur le plan épidémiologique. Ces données expérimentales nous permettront de mieux connaître, en première intention, la nature des paramètres inflammatoires retrouvés selon le type d'exposition.

Tableau 29. Biomarqueurs de l'air exhalé et expositions professionnelles ou environnementales

Exposition / Profession	Biomarqueur	Remarques	Réf.	
Asthme, Rhinite, Allergie d'origine professionnelle	Latex	FeNO _{0,1}	↑ (26)	
	Latex	H ₂ O ₂ (EBC)	↑ (126)	
	Latex	FeNO _{0,05}	↑ (126)	
	Allergènes professionnels	8-isoprostane (EBC)	↑ dans les TBP (91)	
	Isocyanates	FeNO	↑ (21,25)	
	Animaux de laboratoire	FeNO	↑ (27)	
	Boulangers	FeNO	↑ (184)	
	Fermiers	FeNO	↑ (184)	
	Personnels de santé	FeNO	↑ (184)	
Maîtres nageurs	FeNO _{0,05}	↑ avec HRB (29)		
Composés minéraux	Amiante	FeNO _{0,25}	↑ (120)	
	Amiante	H ₂ O ₂ (EBC)	↑ (120)	
	Amiante	NOx (EBC)	↔ (120)	
	Amiante	8-isoprostane (EBC)	↑ (93-95,120)	
	Amiante	MDA (EBC)	↑ (93)	
	Amiante	8-isoprostane (EBC)	↑ (avec TDM (108)) (107,108)	
	Silicose	8-isoprostane (EBC)	↑ (92-94)	
	Silicose	MDA (EBC)	↑ (93)	
Mica	Mica (EBC)	+	(17)	
Autres composés toxiques professionnels	Fumées de soudage	H ₂ O ₂ (EBC)	↑ (123)	
	Fumées de soudage	MDA (EBC)	↔ (123)	
	Fumées de soudage	Nitrite (NO ₂) (EBC)	(78)	
	Fumées de soudage	Nitrate (NO ₃) (EBC)	↑ (78,123)	
	Fumées de soudage	Nickel (EBC)	+	(16)
	Fumées de soudage	Fer (EBC)	+	(16)
	Chrome (Cr)	MDA (EBC)	↑ (13)	
	Chrome (Cr)	H ₂ O ₂ (EBC)	↑ (13)	
	Chrome (Cr)	Nitrite (NO ₂) (EBC)	↑ (77)	
	Chrome (Cr)	Chrome (EBC)	+	(13,14)
	Cobalt (Co)	MDA (EBC)	↑ (15)	
	Cobalt (Co)	Cobalt (EBC)	+	(15)
	Tungstène (W)	MDA (EBC)	↑ (15)	
	Tungstène	Tungstène (EBC)	+	(15)
	Personnel d'entretien hospitalier	H ₂ O ₂ (EBC)	↑ (16)	
Poussières agricoles (poussières de grains et endotoxines)	8-isoprostane (EBC)	Corrélation avec l'exposition (109)		
Toxiques environnementaux	Ozone	H ₂ O ₂ (EBC)	↑ (7)	
	Ozone	8-isoprostane (EBC)	↑ (précoce) (7)	
	Ozone	MDA (EBC)	↑ avec ↓ du VEMS (7,130,136)	
	PM <2.5µg/m ³	MDA (EBC)	↑ avec ↓ du VEMS (130)	

FeNOx: Fraction exhalé du NO à x litres/s; EBC: Condensat de l'air exhalé; H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène; MDA: Malondialdéhyde; HRB: Hyperréactivité bronchique; VEMS: Volume expiré maximal en 1 seconde; TBP: Test de broncho provocation; TDM: Tomodensitométrie; +: présence

Références

1. Balbi B, Pignatti P, Corradi M, Baiardi P, Bianchi L, Brunetti G, et al. Bronchoalveolar lavage, sputum and exhaled clinically relevant inflammatory markers: values in healthy adults. *Eur Respir J*. 2007 oct;30(4):769-81.
2. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir. J*. 2000 sept;16(3):534-54.
3. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*. 2005;26(3):523-48.
4. van der Vaart H, Postma DS, Timens W, ten Hacken NHT. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*. 2004 août;59(8):713-21.
5. Janicka M, Kot-Wasik A, Kot J, Namieśnik J. Isoprostanes-biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluating oxidative stress and analysis. *Int J Mol Sci*. 2010;11(11):4631-59.
6. Snell N, Newbold P. The clinical utility of biomarkers in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(3):222-35.
7. Corradi M, Alinovi R, Goldoni M, Vettori M, Folesani G, Mozzoni P, et al. Biomarkers of oxidative stress after controlled human exposure to ozone. *Toxicol Lett*. 2002 août 5;134(1-3):219-25.
8. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 avr 15;171(8):912-30.
9. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, et al. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011 sept 1;184(5):602-15.
10. Bucca C, Cicolin A, Guida G, Heffler E, Brussino L, Rolla G. Exhaled nitric oxide (F(E)NO) in non-pulmonary diseases. *J Breath Res*. 2012 juin;6(2):027104.
11. Vignola AM, Rennar SI, Hargreave FE, Fah JV, Bonsignore MR, Djukanović R, et al. Standardised methodology of sputum induction and processing. Future directions. *Eur Respir J Suppl*. 2002 sept;37:51s-55s.
12. Hunt J. Exhaled breath condensate: an overview. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007 nov;27(4):587-96.
13. Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, Andreoli R, Vettori MV, Corradi M, et al. The effect of inhaled chromium on different exhaled breath condensate biomarkers among chrome-plating workers. *Environ Health Perspect*. 2006 avr;114(4):542-6.
14. Goldoni M, Caglieri A, De Palma G, Acampa O, Gergelova P, Corradi M, et al. Chromium in exhaled breath condensate (EBC), erythrocytes, plasma and urine in the biomonitoring of chrome-plating workers exposed to soluble Cr(VI). *J Environ Monit*. 2010 févr;12(2):442-7.
15. Goldoni M, Catalani S, De Palma G, Manini P, Acampa O, Corradi M, et al. Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten. *Environ Health Perspect*. 2004 sept;112(13):1293-8.

16. Hoffmeyer F, Weiss T, Lehnert M, Pesch B, Berresheim H, Henry J, et al. Increased metal concentrations in exhaled breath condensate of industrial welders. *J Environ Monit.* 2011 janv;13(1):212-8.
17. Falgayrac G, Chérot-Kornobis N, Broucker V de, Hulo S, Edmé J, Sobaszek A, et al. Noninvasive molecular identification of particulate matter in lungs by Raman microspectrometry. *J Raman Spectrosc.* 2011 juin 1;42(6):1484-7.
18. Rosias P. Methodological aspects of exhaled breath condensate collection and analysis. *Journal of Breath Research.* 2012 avr 20;6(2):027102.
19. Dompeling E, Rosias PPR, Jobsis Q. Chapter 11. Exhaled breath condensate sample collection: standards and open issues. *European Respiratory Monograph.* 2010 sept 1;(49):152-61.
20. Lemièrre C, D'Alpaos V, Chaboillez S, César M, Wattiez M, Chiry S, et al. Investigation of occupational asthma: sputum cell counts or exhaled nitric oxide? *Chest.* 2010 mars;137(3):617-22.
21. Barbinova L, Baur X. Increase in exhaled nitric oxide (eNO) after work-related isocyanate exposure. *Int Arch Occup Environ Health.* 2006 mai;79(5):387-95.
22. Thomassen MJ, Raychaudhuri B, Dweik RA, Farver C, Buhrow L, Malur A, et al. Nitric oxide regulation of asthmatic airway inflammation with segmental allergen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999 déc;104(6):1174-82.
23. Smith AD, Cowan JO, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Jackson P, et al. Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004 févr 15;169(4):473-8.
24. Dressel H, Gross C, de la Motte D, Sultz J, Jörres RA, Nowak D. Educational intervention in farmers with occupational asthma: long-term effect on exhaled nitric oxide. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2009;19(1):49-53.
25. Ferrazzoni S, Scarpa MC, Guarnieri G, Corradi M, Mutti A, Maestrelli P. Exhaled nitric oxide and breath condensate pH in asthmatic reactions induced by isocyanates. *Chest.* 2009;136(1):155-62.
26. Baur X, Barbinova L. Latex allergen exposure increases exhaled nitric oxide in symptomatic healthcare workers. *Eur. Respir. J.* 2005 févr;25(2):309-16.
27. Hewitt RS, Smith AD, Cowan JO, Schofield JC, Herbison GP, Taylor DR. Serial exhaled nitric oxide measurements in the assessment of laboratory animal allergy. *J Asthma.* 2008 mars;45(2):101-7.
28. Pala G, Pignatti P, Moscato G. The use of fractional exhaled nitric oxide in investigation of work-related cough in a hairdresser. *Am. J. Ind. Med.* 2011 juill;54(7):565-8.
29. Demange V, Bohadana A, Massin N, Wild P. Exhaled nitric oxide and airway hyperresponsiveness in workers: a preliminary study in lifeguards. *BMC Pulm Med.* 2009;9:53.
30. Tsoukias NM, Tannous Z, Wilson AF, George SC. Single-exhalation profiles of NO and CO₂ in humans: effect of dynamically changing flow rate. *J Appl Physiol.* 1998;85(2):642-52.
31. Kerckx Y, Michils A, Van Muylem A. Airway contribution to alveolar nitric oxide in healthy subjects and stable asthma patients. *J. Appl. Physiol.* 2008 avr;104(4):918-24.
32. Edmé JL, Nisse C, Lepage N, Matran R, Sobaszek A, Boulenguez C. Évaluation de la mesure du NO expiré par deux techniques: étude de reproductibilité. *Rev Mal Respir.* 2006 janv;23 Suppl1:115.

33. Dodig S, Richter D, Zrinski-Topić R. Inflammatory markers in childhood asthma. *Clin Chem Lab Med.* 2011 avr;49(4):587-99.
34. Hillas G, Loukides S, Kostikas K, Bakakos P. Biomarkers Obtained by Non-Invasive Methods in Patients with COPD: Where do we Stand, what do we Expect? *Curr Med Chem.* 2009;16(22):2824-38.
35. De Vuyst P, Karjalainen A, Dumortier P, Pairon JC, Monsó E, Brochard P, et al. Guidelines for mineral fibre analyses in biological samples: report of the ERS Working Group. *European Respiratory Society. Eur. Respir. J.* 1998 juin;11(6):1416-26.
36. Pairon JC, Dumortier P. Role of biometric analysis in the retrospective assessment of exposure to asbestos. *Rev Mal Respir.* 1999 déc;16(6 Pt 2):1219-35.
37. Teschler H, Thompson AB, Dollenkamp R, Konietzko N, Costabel U. Relevance of asbestos bodies in sputum. *Eur. Respir. J.* 1996 avr;9(4):680-6.
38. Quirce S, Lemière C, de Blay F, del Pozo V, Gerth Van Wijk R, Maestrelli P, et al. Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings. *Allergy.* 2010 avr;65(4):445-58.
39. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Leigh R, Djukanović R, Sterk PJ. Safety of sputum induction. *Eur Respir J Suppl.* 2002 sept;37:9s-18s.
40. Fernández-Nieto M, Sastre B, Sastre J, Lahoz C, Quirce S, Madero M, et al. Changes in sputum eicosanoids and inflammatory markers after inhalation challenges with occupational agents. *Chest.* 2009 nov;136(5):1308-15.
41. Corradi M, Pignatti P, Manini P, Andreoli R, Goldoni M, Poppa M, et al. Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur Respir J.* 2004 déc;24(6):1011-7.
42. van der Vaart H, Postma DS, Timens W, Kauffman HF, Hylkema MN, Ten Hacken NHT. Repeated sputum inductions induce a transient neutrophilic and eosinophilic response. *Chest.* 2006 oct;130(4):1157-64.
43. Chapman EA, Thomas PS, Yates DH. Breath analysis in asbestos-related disorders: a review of the literature and potential future applications. *J Breath Res.* 2010 sept;4(3):034001.
44. Fairchild CI, Stampfer JF. Particle concentration in exhaled breath. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1987 nov;48(11):948-9.
45. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001 sept 1;164(5):731-7.
46. Johnson GR, Morawska L. The mechanism of breath aerosol formation. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2009 sept;22(3):229-37.
47. Almstrand A-C, Bake B, Ljungström E, Larsson P, Bredberg A, Mirgorodskaya E, et al. Effect of airway opening on production of exhaled particles. *J. Appl. Physiol.* 2010 mars;108(3):584-8.
48. Debley JS, Ohanian AS, Spiekerman CF, Aitken ML, Hallstrand TS. Effects of bronchoconstriction, minute ventilation, and deep inspiration on the composition of exhaled breath condensate. *Chest.* 2011 janv;139(1):16-22.
49. Rosias PPR, Jöbsis Q, van de Kant K, Robroeks C, van Schayck CP, Zimmermann LJI, et al. Global condensation: a « climate change » towards better standardisation of exhaled breath condensate measurements. *Eur. Respir. J.* 2008 mars;31(3):684-5.

50. Almstrand A-C, Ljungström E, Lausmaa J, Bake B, Sjövall P, Olin A-C. Airway monitoring by collection and mass spectrometric analysis of exhaled particles. *Anal. Chem.* 2009 janv 15;81(2):662-8.
51. Knobloch H, Becher G, Decker M, Reinhold P. Evaluation of H₂O₂ and pH in exhaled breath condensate samples: methodical and physiological aspects. *Biomarkers.* 2008 mai;13(3):319-41.
52. Reinhold P, Knobloch H. Exhaled breath condensate: lessons learned from veterinary medicine. *J. Breath Res.* 2010 mars;4(1):017001.
53. de Broucker V, Hassoun SM, Hulo S, Chérot-Kornobis N, Nevière R, Matran R, et al. Non-invasive collection of exhaled breath condensate in rats: Evaluation of pH, H₂O₂ and NO_x in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *The Veterinary Journal.* DOI:10.1016/j.tvjl.2012.04.009 (in press).
54. Rosias PP, Robroeks CM, Niemarkt HJ, Kester AD, Vernooij JH, Suykerbuyk J, et al. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate. *Eur Respir J.* 2006;28(5):1036-41.
55. Samitas K, Chorianopoulos D, Vittorakis S, Zervas E, Economidou E, Papatheodorou G, et al. Exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in patients with asthma and their relation to clinical severity. *Respir Med.* 2009 mai;103(5):750-6.
56. Loukides L, Bakakos P, Kostikas K. Chapter 12. Exhaled breath condensate: hydrogen peroxide. *European Respiratory Monograph.* 2010 sept 1;(49):162-72.
57. Montuschi P. Chapter 15. Exhaled breath condensate: 8-isoprostane and eicosanoids. *European Respiratory Monograph.* 2010;49:196-206.
58. Donnelly LE. Chapter 16. Exhaled breath condensate: nitric oxide-related compounds. *European Respiratory Monograph.* 2010;49:207-16.
59. Gessner C, Wirtz H. Chapter 17. Interleukins and other proteins. *European Respiratory Monograph.* 2010 sept 1;(49):217-30.
60. Edmé JL, Tellart AS, Launay D, Nevière R, Grutzmacher C, Boulenguez C, et al. Cytokine concentrations in exhaled breath condensates in systemic sclerosis. *Inflamm Res.* 2008;57(4):151-6.
61. Koutsokera A, Loukides S, Gourgoulialis KI, Kostikas K. Biomarkers in the exhaled breath condensate of healthy adults: mapping the path towards reference values. *Curr Med Chem.* 2008;15(6):620-30.
62. Chérot-Kornobis N, Hulo S, Edmé J-L, de Broucker V, Matran R, Sobaszek A. Analysis of nitrogen oxides (NO_x) in the exhaled breath condensate (EBC) of subjects with asthma as a complement to exhaled nitric oxide (FeNO) measurements: a cross-sectional study. *BMC Res Notes.* 2011;4:202.
63. de Lema JB, González M, Vigil L, Casan P. Exhaled breath condensate: standardized collection of samples from healthy volunteers. *Arch. Bronconeumol.* 2005 oct;41(10):584-6.
64. Ganas K, Loukides S, Papatheodorou G, Panagou P, Kalogeropoulos N. Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma. *Respir Med.* 2001 août;95(8):649-54.
65. Czebe K, Barta I, Antus B, Valyon M, Horváth I, Kullmann T. Influence of condensing equipment and temperature on exhaled breath condensate pH, total protein and leukotriene concentrations. *Respir Med.* 2008 mai;102(5):720-5.

66. Antus B, Barta I, Kullmann T, Lazar Z, Valyon M, Horvath I, et al. Assessment of exhaled breath condensate pH in exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease: A longitudinal study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010 déc 15;182(12):1492-7.
67. Prieto L, Ferrer A, Palop J, Domenech J, Llusar R, Rojas R. Differences in exhaled breath condensate pH measurements between samples obtained with two commercial devices. *Respir Med.* 2007;101(8):1715-20.
68. Chow S, Yates DH, Thomas PS. Reproducibility of exhaled breath condensate markers. *Eur Respir J.* 2008;32(4):1124-6.
69. Reinhold P, Jaeger J, Schroeder C. Evaluation of methodological and biological influences on the collection and composition of exhaled breath condensate. *Biomarkers.* 2006 avr;11(2):118-42.
70. Chinn S. Statistics in respiratory medicine. 2. Repeatability and method comparison. *Thorax.* 1991 juin;46(6):454-6.
71. Sack U, Scheibe R, Wötzel M, Hammerschmidt S, Kuhn H, Emmrich F, et al. Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate. *Cytometry A.* 2006 mars;69(3):169-72.
72. Garey KW, Neuhauser MM, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healthy smokers. *Chest.* 2004;125(1):22-6.
73. Simpson JL, Wood LG, Gibson PG. Inflammatory mediators in exhaled breath, induced sputum and saliva. *Clin Exp Allergy.* 2005 sept;35(9):1180-5.
74. Robbins RA, Hadelik K, Nelson D, Sato E, Hoyt JC. Nitric oxide, peroxynitrite, and lower respiratory tract inflammation. *Immunopharmacology.* 2000;48(3):217-21.
75. Mehta V, Stokes JR, Berro A, Romero FA, Casale TB. Time-dependent effects of inhaled corticosteroids on lung function, bronchial hyperresponsiveness, and airway inflammation in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2009;103(1):31-7.
76. Corradi M, Gergelova P, Mutti A. Use of exhaled breath condensate to investigate occupational lung diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010 avr;10(2):93-8.
77. Murgia N, Muzi G, Dell' Omo M, Montuschi P, Melchiorri D, Ciabattini G, et al. Induced sputum, exhaled breath condensate and nasal lavage fluid in electroplating workers exposed to chromium. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2006 déc;19(4 Suppl):67-71.
78. Brand P, Gube M, Gerards K, Bertram J, Kaminski H, John AC, et al. Internal exposure, effect monitoring, and lung function in welders after acute short-term exposure to welding fumes from different welding processes. *J. Occup. Environ. Med.* 2010 sept;52(9):887-92.
79. Bouzigon E, Monier F, Boussaha M, Le Moual N, Huyvaert H, Matran R, et al. Associations between Nitric Oxide Synthase Genes and Exhaled NO-Related Phenotypes according to Asthma Status. *PLoS One.* 2012;7(5):e36672.
80. Ratnawati, Morton J, Henry RL, Thomas PS. Exhaled breath condensate nitrite/nitrate and pH in relation to pediatric asthma control and exhaled nitric oxide. *Pediatr Pulmonol.* 2006;41(10):929-36.
81. Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax.* 1999;54(12):1061-9.
82. Chladkova J, Krcmova I, Chladek J, Cap P, Micuda S, Hanzalkova Y. Validation of nitrite and nitrate measurements in exhaled breath condensate. *Respiration.* 2006;73(2):173-9.

83. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 déc;87(23):9383-7.
84. Delanty N, Reilly M, Pratico D, FitzGerald DJ, Lawson JA, FitzGerald GA. 8-Epi PGF₂ alpha: specific analysis of an isoeicosanoid as an index of oxidant stress in vivo. *Br J Clin Pharmacol*. 1996 juill;42(1):15-9.
85. Wood LG, Gibson PG, Garg ML. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur Respir J*. 2003 janv 1;21(1):177-86.
86. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J*. 2004 déc;18(15):1791-800.
87. Kielbasa B, Moeller A, Sanak M, Hamacher J, Hutterli M, Cmiel A, et al. Eicosanoids in exhaled breath condensates in the assessment of childhood asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008 nov;19(7):660-9.
88. Carraro S, Cogo PE, Isak I, Simonato M, Corradi M, Carnielli VP, et al. EIA and GC/MS analysis of 8-isoprostane in EBC of children with problematic asthma. *Eur Respir J*. 2010 juin;35(6):1364-9.
89. Sanak M, Gielicz A, Nagraba K, Kaszuba M, Kumik J, Szczeklik A. Targeted eicosanoids lipidomics of exhaled breath condensate in healthy subjects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010 juill 1;878(21):1796-800.
90. Zhang B, Saku K. Control of matrix effects in the analysis of urinary F₂-isoprostanes using novel multidimensional solid-phase extraction and LC-MS/MS. *J Lipid Res*. 2007 mars;48(3):733-44.
91. Klusackova P, Lebedova J, Kacer P, Kuzma M, Brabec M, Pelcova D, et al. Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate in bronchoprovocation tests with occupational allergens. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 2008 mai;78(4-5):281-92.
92. Pelclová D, Fenclová Z, Kacer P, Navrátil T, Kuzma M, Lebedová JK, et al. 8-isoprostane and leukotrienes in exhaled breath condensate in Czech subjects with silicosis. *Ind Health*. 2007 déc;45(6):766-74.
93. Syslová K, Kacer P, Kuzma M, Najmanová V, Fenclová Z, Vlcková S, et al. Rapid and easy method for monitoring oxidative stress markers in body fluids of patients with asbestos or silica-induced lung diseases. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009 août 15;877(24):2477-86.
94. Syslová K, Kačer P, Kuzma M, Pankráčová A, Fenclová Z, Vlčková š, et al. LC-ESI-MS/MS method for oxidative stress multimarker screening in the exhaled breath condensate of asbestosis/silicosis patients. *J Breath Res*. 2010 mars;4(1):017104.
95. Syslová K, Kacer P, Kuzma M, Klusácková P, Fenclová Z, Lebedová J, et al. Determination of 8-iso-prostaglandin F₂[alpha] in exhaled breath condensate using combination of immunoseparation and LC-ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2008 mai 1;867(1):8-14.
96. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 mai 15;165(10):1364-70.
97. Zanconato S, Carraro S, Corradi M, Alinovi R, Pasquale MF, Piacentini G, et al. Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with stable and unstable asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 févr;113(2):257-63.
98. Tufvesson E, Bjermer L. Methodological improvements for measuring eicosanoids and cytokines in exhaled breath condensate. *Respir Med*. 2006 janv;100(1):34-8.

99. Robroeks CMHHT, van de Kant KDG, Jöbsis Q, Hendriks HJE, van Gent R, Wouters EFM, et al. Exhaled nitric oxide and biomarkers in exhaled breath condensate indicate the presence, severity and control of childhood asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007 sept;37(9):1303-11.
100. Caballero Balanzá S, Martorell Aragonés A, Cerdá Mir JC, Ramírez JB, Navarro Iváñez R, Navarro Soriano A, et al. Leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with episodic and persistent asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(3):237-43.
101. Brussino L, Badiu I, Sciascia S, Bugiani M, Heffler E, Guida G, et al. Oxidative stress and airway inflammation after allergen challenge evaluated by exhaled breath condensate analysis. *Clin Exp Allergy*. 2010 nov;40(11):1642-7.
102. Mondino C, Ciabattini G, Koch P, Pistelli R, Trové A, Barnes PJ, et al. Effects of inhaled corticosteroids on exhaled leukotrienes and prostanoids in asthmatic children. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2004 oct;114(4):761-7.
103. Papaioannou AI, Mazioti A, Kiroopoulos T, Tsilioni I, Koutsokera A, Tanou K, et al. Systemic and airway inflammation and the presence of emphysema in patients with COPD. *Respir Med*. 2010 févr;104(2):275-82.
104. Psathakis K, Mermigkis D, Papatheodorou G, Loukides S, Panagou P, Polychronopoulos V, et al. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Invest*. 2006 mai;36(5):362-7.
105. Roca O, Gómez-Ollés S, Cruz M-J, Muñoz X, Griffiths MJD, Masclans JR. Mechanical ventilation induces changes in exhaled breath condensate of patients without lung injury. *Respir Med*. 2010 juin;104(6):822-8.
106. Muller WG, Morini F, Eaton S, Peters M, Jaffe A. Safety and feasibility of exhaled breath condensate collection in ventilated infants and children. *Eur Respir J*. 2006 sept;28(3):479-85.
107. Pelclová D, Fenclová Z, Kacer P, Kuzma M, Navrátil T, Lebedová J. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress in exhaled breath condensate in subjects with asbestos exposure. *Ind Health*. 2008 oct;46(5):484-9.
108. Lehtimäki L, Oksa P, Järvenpää R, Vierikko T, Nieminen R, Kankaanranta H, et al. Pulmonary inflammation in asbestos-exposed subjects with borderline parenchymal changes on HRCT. *Respir Med*. 2010 juill;104(7):1042-9.
109. Do R, Bartlett KH, Dimich-Ward H, Chu W, Kennedy SM. Biomarkers of airway acidity and oxidative stress in exhaled breath condensate from grain workers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2008 nov 15;178(10):1048-54.
110. Cruz M-J, Sánchez-Vidaurre S, Romero P-V, Morell F, Muñoz X. Impact of age on pH, 8-isoprostane, and nitrogen oxides in exhaled breath condensate. *Chest*. 2009;135(2):462-7.
111. Hoffmeyer F, Harth V, Bunger J, Bruning T, Raulf-Heimsoth M. Leukotriene B4, 8-isoprostaglandin F2 alpha, and pH in exhaled breath condensate from asymptomatic smokers. *J Physiol Pharmacol*. 2009 nov;60 Suppl 5:57-60.
112. Leung TF, Li CY, Yung E, Liu EKH, Lam CWK, Wong GWK. Clinical and technical factors affecting pH and other biomarkers in exhaled breath condensate. *Pediatr. Pulmonol*. 2006 janv;41(1):87-94.
113. Carpagnano GE, Palladino GP, Lacedonia D, Koutelou A, Orlando S, Foschino-Barbaro MP. Neutrophilic airways inflammation in lung cancer: the role of exhaled LTB-4 and IL-8. *BMC Cancer*. 2011;11:226.

114. Borrill ZL, Starkey RC, Singh SD. Variability of exhaled breath condensate leukotriene B4 and 8-isoprostane in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2007;2(1):71-6.
115. Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. Oxidative stress in expired breath condensate of patients with COPD. *Chest.* 2003 oct;124(4):1373-80.
116. Borrill ZL, Roy K, Vessey RS, Woodcock AA, Singh D. Non-invasive biomarkers and pulmonary function in smokers. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2008;3(1):171-83.
117. Ueno T, Kataoka M, Hirano A, Iio K, Tanimoto Y, Kanehiro A, et al. Inflammatory markers in exhaled breath condensate from patients with asthma. *Respirology.* 2008;13(5):654-63.
118. Łuczyńska M, Szkudlarek U, Dzionkowska-Bartkowiak B, Waszczykowska E, Kasielski M, Sysa-Jedrzejowska A, et al. Elevated exhalation of hydrogen peroxide in patients with systemic sclerosis. *Eur J Clin Invest.* 2003 mars;33(3):274-9.
119. Stolarek RA, Potargowicz E, Seklewska E, Jakubik J, Lewandowski M, Jeziorski A, et al. Increased H₂O₂ level in exhaled breath condensate in primary breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010 juin;136(6):923-30.
120. Chow S, Campbell C, Sandrini A, Thomas PS, Johnson AR, Yates DH. Exhaled breath condensate biomarkers in asbestos-related lung disorders. *Respir Med.* 2009 août;103(8):1091-7.
121. Horváth I, Donnelly LE, Kiss A, Kharitonov SA, Lim S, Fan Chung K, et al. Combined Use of Exhaled Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide in Monitoring Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 1998 oct 1;158(4):1042-6.
122. Corradi M, Gergelova P, Di Pilato E, Folesani G, Goldoni M, Andreoli R, et al. Effect of exposure to detergents and other chemicals on biomarkers of pulmonary response in exhaled breath from hospital cleaners: a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health.* 2012 mai;85(4):389-96.
123. Gube M, Ebel J, Brand P, Göen T, Holzinger K, Reisgen U, et al. Biological effect markers in exhaled breath condensate and biomonitoring in welders: impact of smoking and protection equipment. *Int Arch Occup Environ Health.* 2010 oct;83(7):803-11.
124. Teng Y, Sun P, Zhang J, Yu R, Bai J, Yao X, et al. Hydrogen peroxide in exhaled breath condensate in patients with asthma: a promising biomarker? *Chest.* 2011 juill;140(1):108-16.
125. Borrill ZL, Roy K, Singh D. Exhaled breath condensate biomarkers in COPD. *Eur. Respir. J.* 2008 août;32(2):472-86.
126. de Broucker V, Hulo S, Cherot-Kornobis N, Lartigau-Sezary I, Matran R, Sobaszek A, et al. Interest of exhaled biomarkers in occupational asthma to latex: a case report. *Arch Environ Occup Health.* 2012 juill;67(3):170-6.
127. Schleiss MB, Holz O, Behnke M, Richter K, Magnussen H, Jörres RA. The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate. *Eur. Respir. J.* 2000 déc;16(6):1115-8.
128. van Beurden WJC, Dekhuijzen PNR, Harff GA, Smeenk FWJM. Variability of exhaled hydrogen peroxide in stable COPD patients and matched healthy controls. *Respiration.* 2002;69(3):211-6.
129. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology.* 2002 déc 27;181-182:219-22.
130. Romieu I, Barraza-Villarreal A, Escamilla-Núñez C, Almstrand A-C, Diaz-Sanchez D, Sly PD, et al. Exhaled breath malondialdehyde as a marker of effect of exposure to air pollution in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 avr;121(4):903-9.

131. Corradi M, Rubinstein I, Andreoli R, Manini P, Caglieri A, Poli D, et al. Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(10):1380-6.
132. Corradi M, Folesani G, Andreoli R, Manini P, Bodini A, Piacentini G, et al. Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(3):395-9.
133. Bartoli ML, Novelli F, Costa F, Malagrino L, Melosini L, Bacci E, et al. Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases. *Mediators Inflamm.* 2011;2011:891752.
134. Antczak A, Nowak D, Shariati B, Król M, Piasecka G, Kurmanowska Z. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur Respir J.* 1997 juin;10(6):1235-41.
135. Lärstad M, Ljungkvist G, Olin A-C, Torén K. Determination of malondialdehyde in breath condensate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002 janv 5;766(1):107-14.
136. Vagaggini B, Bartoli MLE, Cianchetti S, Costa F, Bacci E, Dente FL, et al. Increase in markers of airway inflammation after ozone exposure can be observed also in stable treated asthmatics with minimal functional response to ozone. *Respir Res.* 2010;11:5.
137. Andreoli R, Manini P, Corradi M, Mutti A, Niessen WMA. Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003;17(7):637-45.
138. Dut R, Dizdar EA, Birben E, Sackesen C, Soyer OU, Besler T, et al. Oxidative stress and its determinants in the airways of children with asthma. *Allergy.* 2008 déc;63(12):1605-9.
139. Kostikas K, Koutsokera A, Papiris S, Gourgoulidis KI, Loukides S. Exhaled breath condensate in patients with asthma: implications for application in clinical practice. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(4):557-65.
140. Cherot-Kornobis N, Edme J, Briand G, Sobaszek A, Neviere R, Matran R. How to measure exhaled breath MDA in normal subjects: assessment of two ionisation modes used by LC-MS/MS. *Eur Respir J.* 2008;32(S52):723.
141. van de Kant KDG, Klaassen EMM, Jöbsis Q, Koers K, Rijkers GT, van der Grinten CP, et al. Wheezing in preschool children is associated with increased levels of cytokines/chemokines in exhaled breath condensate. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 sept;126(3):669-71.
142. Robroeks CMHHT, Rijkers GT, Jöbsis Q, Hendriks HJE, Damoiseaux JGMC, Zimmermann LJI, et al. Increased cytokines, chemokines and soluble adhesion molecules in exhaled breath condensate of asthmatic children. *Clin Exp Allergy.* 2010 janv;40(1):77-84.
143. Rosias PPR, Dompeling E, Dentener MA, Pennings HJ, Hendriks HJE, Van Iersel MPA, et al. Childhood asthma: exhaled markers of airway inflammation, asthma control score, and lung function tests. *Pediatr Pulmonol.* 2004 août;38(2):107-14.
144. Ko FW, Leung T-F, Wong GW, Ngai J, To KW, Ng S, et al. Measurement of tumor necrosis factor-alpha, leukotriene B4, and interleukin 8 in the exhaled breath condensate in patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2009;4(1):79-86.
145. Robroeks CMHHT, Roozeboom MH, de Jong PA, Tiddens HAWM, Jöbsis Q, Hendriks HJ, et al. Structural lung changes, lung function, and non-invasive inflammatory markers in cystic fibrosis. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010 mai;21(3):493-500.

146. Gessner C, Scheibe R, Wötzel M, Hammerschmidt S, Kuhn H, Engelmann L, et al. Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2005 oct;99(10):1229-40.
147. Samet JM. A historical and epidemiologic perspective on respiratory symptoms questionnaires. *Am. J. Epidemiol.* 1978 déc;108(6):435-46.
148. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J.* 2008;31(1):143-78.
149. Juniper EF, O'Byrne PM, Guyatt GH, Ferrie PJ, King DR. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. *Eur. Respir. J.* 1999;14(4):902-7.
150. Martinat Y, Rogeaux Y, Giraud V, Mezzi K. Maîtrise de l'asthme et atteinte des petites voies aériennes: enquête transversale Jacinte (Juniper Asthma Control In a National Transversal Evaluation) en pneumologie libérale. *Rev fr allergol immunol clin.* 2002;42(4):358-66.
151. Juniper EF, Bousquet J, Abetz L, Bateman ED. Identifying « well-controlled » and « not well-controlled » asthma using the Asthma Control Questionnaire. *Respir Med.* 2006;100(4):616-21.
152. Pauwels RA, Buist AS, Ma P, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary. *Respir Care.* 2001 août;46(8):798-825.
153. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004 mars 4;350(10):1005-12.
154. Tillie Leblond I, Masure F, Housset B, Roche N, Perez T, Birraux G, et al. Utilisation de l'index BOD comme facteur prédictif des hospitalisations pour exacerbation chez des patients atteints de BPCO suivis dans l'étude EXACO. *Rev Mal Respir.* 2009;26(Supplement 1):146.
155. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* 1988 févr;15(2):202-5.
156. Hachulla E, Launay D. Diagnosis and classification of systemic sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011 avr;40(2):78-83.
157. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur. Respir. J.* 2005 août;26(2):319-38.
158. Jackson AS, Sandrini A, Campbell C, Chow S, Thomas PS, Yates DH. Comparison of biomarkers in exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007 févr 1;175(3):222-7.
159. Glass DC, Gray CN. Estimating Mean Exposures from Censored Data: Exposure to Benzene in the Australian Petroleum Industry. *Ann Occup Hyg.* 2001 janv 5;45(4):275-82.
160. Kanazawa H, Shoji S, Hirata K, Kurthara N, Yoshikawa J. Role of endogenous nitric oxide in airflow obstruction in smokers. *Chest.* 1996 oct;110(4):927-9.
161. Hillas G, Kostikas K, Mantzouranis K, Bessa V, Kontogianni K, Papadaki G, et al. Exhaled nitric oxide and exhaled breath condensate pH as predictors of sputum cell counts in optimally treated asthmatic smokers. *Respirology.* 2011 juill;16(5):811-8.

162. Corradi M, Montuschi P, Donnelly LE, Pesci A, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(4):854-8.
163. Papaioannou AI, Koutsokera A, Tanou K, Kiropoulos TS, Tsilioni I, Oikonomidi S, et al. The acute effect of smoking in healthy and asthmatic smokers. *Eur. J. Clin. Invest.* 2010 févr;40(2):103-9.
164. Tanou K, Koutsokera A, Kiropoulos TS, Maniati M, Papaioannou AI, Georga K, et al. Inflammatory and oxidative stress biomarkers in allergic rhinitis: the effect of smoking. *Clin Exp Allergy.* 2009 mars;39(3):345-53.
165. Corradi M, Majori M, Cacciani GC, Consigli GF, de' Munari E, Pesci A. Increased exhaled nitric oxide in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1999 juill;54(7):572-5.
166. Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, Keatings V, Barnes PJ. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995 août;152(2):609-12.
167. Baraldi E, Giordano G, Pasquale MF, Carraro S, Mardegan A, Bonetto G, et al. 3-Nitrotyrosine, a marker of nitrosative stress, is increased in breath condensate of allergic asthmatic children. *Allergy.* 2006 janv;61(1):90-6.
168. García-Río F, Romero D, Lores V, Casitas R, Hernanz A, Galera R, et al. Dynamic Hyperinflation, Arterial Blood Oxygen, and Airway Oxidative Stress in Stable Patients With COPD. *Chest.* 2011 oct;140(4):961-9.
169. Cottin V, Cordier J-F. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Rev Prat.* 2006 juin 15;56(11):1165-71.
170. Bussone G, Mouthon L. Interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2011 mars;10(5):248-55.
171. Wuttge DM, Bozovic G, Hesselstrand R, Aronsson D, Bjermer L, Scheja A, et al. Increased alveolar nitric oxide in early systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2010 oct;28(5 Suppl 62):S5-9.
172. Tiev KP, Hua-Huy T, Kettaneh A, Allanore Y, Le-Dong N-N, Duong-Quy S, et al. Alveolar concentration of nitric oxide predicts pulmonary function deterioration in scleroderma. *Thorax.* 2012 févr;67(2):157-63.
173. Bloemen K, Van Den Heuvel R, Govarts E, Hooyberghs J, Nelen V, Witters E, et al. A new approach to study exhaled proteins as potential biomarkers for asthma. *Clin. Exp. Allergy.* 2011 mars;41(3):346-56.
174. Dompeling E, Jöbsis Q. Proteomics of exhaled breath condensate: a realistic approach in children with asthma? *Clin. Exp. Allergy.* 2011 mars;41(3):299-301.
175. Malinovsky A, Pizzimenti S, Sciascia S, Heffler E, Badiu I, Rolla G. Exhaled breath condensate nitrates, but not nitrites or FENO, relate to asthma control. *Respir Med.* 2011 juill;105(7):1007-13.
176. Rihák V, Zatloukal P, Chládková J, Zimulová A, Havlíčková Z, Chládek J. Nitrite in exhaled breath condensate as a marker of nitrosative stress in the airways of patients with asthma, COPD, and idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Lab. Anal.* 2010;24(5):317-22.
177. Chow S, Thomas PS, Malouf M, Yates DH. Exhaled breath condensate (EBC) biomarkers in pulmonary fibrosis. *J Breath Res.* 2012 mars;6(1):016004.

178. Corradi M, Pignatti P, Brunetti G, Goldoni M, Caglieri A, Nava S, et al. Comparison between exhaled and bronchoalveolar lavage levels of hydrogen peroxide in patients with diffuse interstitial lung diseases. *Acta Biomed.* 2008;79 Suppl 1:73-8.
179. Petrosyan M, Perraki E, Simoes D, Koutsourelakis I, Vagiakis E, Roussos C, et al. Exhaled breath markers in patients with obstructive sleep apnoea. *Sleep Breath.* 2008 août;12(3):207-15.
180. Carpenter CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest.* 1998 déc;114(6):1653-9.
181. Montuschi P. Exhaled breath condensate analysis in patients with COPD. *Clin. Chim. Acta.* 2005 juin;356(1-2):22-34.
182. Cracowski JL, Stanke-Labesque F, Souvignet C, Bessard G. Isoprostanes: new markers of oxidative stress in human diseases. *Presse Med.* 2000 mars;29(11):604-10.
183. Chérot-Kornobis N, Hulo S, de Broucker V, Hassoun S, Lepage N, Edmé JL, et al. Induced Sputum, Exhaled NO, and Breath Condensate in Occupational Medicine. *J. Occup. Environ. Med.* 2012 août;54(8):922-7.
184. Swierczyńska-Machura D, Krakowiak A, Wiszniewska M, Dudek W, Walusiak J, Pałczyński C. Exhaled nitric oxide levels after specific inhalatory challenge test in subjects with diagnosed occupational asthma. *Int J Occup Med Environ Health.* 2008;21(3):219-25.

Evaluation méthodologique et clinique des marqueurs de l'atteinte pulmonaire dans l'air exhalé : comparaison de sujets présentant une pathologie respiratoire chronique et sujets témoins

Un accès direct et non invasif à la pathogénèse par l'évaluation de biomarqueurs volatils (FeNO) ou non volatils de l'air exhalé grâce à la méthode des condensats de l'air exhalé (EBC) est utile pour estimer précocement le degré d'atteinte pulmonaire en rapport avec une exposition professionnelle et surveiller son évolution en regard des mesures correctives mises en place. L'étude du NO exhalé (FeNO) est actuellement bien standardisée et l'augmentation exponentielle des publications concernant les EBC reflètent un intérêt croissant pour le diagnostic non invasif des atteintes pulmonaires. Les marqueurs étudiés dans l'air exhalé sont des produits de l'inflammation tels que le FeNO et les cytokines ainsi que des produits du stress oxydant incluant le peroxyde d'hydrogène, les produits de peroxydation lipidique (8-isoprostane, malondialdéhyde) et les oxydes d'azote (NOx). S'agissant d'une technique d'exploration relativement récente, les modalités méthodologiques font encore l'objet de nombreux travaux, les premières recommandations internationales étant apparues en 2005. Les écueils méthodologiques sont nombreux et encore décrits dans la littérature en 2012. Ils concernent toutes les étapes du processus du recueil et d'analyses.

Objectifs : L'objectif principal de notre recherche était dans un premier temps de développer la méthode des EBC pour l'étude des composés de l'air exhalé puis de détecter et quantifier des biomarqueurs tels que les protéines totales, les NOx et le 8-isoprostane dans les EBC d'une population d'adultes sains (n= 48) ou atteints de pathologies pulmonaires telles que l'asthme (n=24), la BPCO (n=20), la pneumopathie interstitielle diffuse (n=27) et la sclérodermie (n=27). L'objectif secondaire était la comparaison des niveaux de biomarqueurs dosés dans les EBC et du FeNO chez les sujets malades par rapport aux témoins.

Résultats/Conclusion : Notre recherche, soutenue l'ANR et l'ANSES, a permis de standardiser la méthodologie de recueil et d'analyse des EBC avec une optimisation du système de recueil et de l'agent coquant pour la détermination de la concentration nécessaire et compatible avec les analyses. Nous maîtrisons le dosage dans les EBC des biomarqueurs tels que les protéines, les NOx et le 8-isoprostane. D'autres biomarqueurs sont encore en cours d'étude tels que le malondialdéhyde et les cytokines. Ce travail méthodologique, publié, a permis dans un second temps la détection (> à 95%) et la quantification de ces biomarqueurs dans les EBC des sujets sains et malades de notre population. L'application de notre méthodologie dans l'étude clinique a montré la pertinence des biomarqueurs dans les pathologies étudiées. Il existe un effet groupe pour les protéines totales en tenant compte du tabac et de l'atopie (p=0.048) avec une augmentation chez les patients BPCO sous corticothérapie (p=0.017). Les niveaux de NOx sont augmentés chez les patients atteints de sclérodermie (p=0.006) et de BPCO (p=0.004) par rapport aux témoins. Les niveaux de FeNO_{0.05} et le NO_{bronchique} sont augmentés chez les asthmatiques (p=0.044 et p=0.043) alors que le NO_{alvéolaire} est augmenté chez les patients atteints de PID et de sclérodermie (p<0.001).

Perspectives : La constitution des valeurs de référence pour les biomarqueurs dosés dans les EBC est nécessaire à l'interprétation des dosages chez les sujets malades. Il convient également de finaliser la standardisation de la mesure des cytokines et du malondialdéhyde et d'explorer de nouveaux biomarqueurs produits lors du stress nitrosant tels que la 3-nitrotyrosine pour compléter les mécanismes physiopathologiques. Enfin le développement de cette méthode non invasive et peu contraignante apparaît prometteuse en clinique médicale dans le suivi individuel de la maladie ou son traitement comme lors d'études épidémiologiques respiratoires sur des populations ayant une exposition professionnelle ou environnementale. Dans ce cadre, l'étude de marqueurs d'exposition tels que les métaux lourds dans les EBC est en cours de développement.